

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

Bell & Howell Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI[®]

Université de Sherbrooke

Signalisation et anoïkose musculaire

Par
Patrick Laprise
Anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire

3 août 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56926-8

Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vi
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	viii
RÉSUMÉ.....	xi

I-INTRODUCTION

1. MUSCLE SQUELETTIQUE.....	1
2. ADHÉSION CELLULAIRE.....	4
2.1 Laminines.....	5
2.2 Lamelle basale des fibres musculaires.....	5
2.3 Intégrines : récepteurs membranaires majeurs des laminines.....	6
2.3.1 Intégrines exprimées par les fibres musculaires squelettiques.....	8
2.3.2 Signalisation par les intégrines.....	9
2.3.2.1 Tyrosines kinases de la famille Src.....	11
2.4 Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine.....	14
3. APOPTOSE.....	16
3.1 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.....	16
3.2 Principaux acteurs de l'apoptose.....	17
3.2.1 Homologues Bcl-2 ; à la frontière entre la survie et la mort cellulaire...	19
3.2.2 Contrôle de la phase décisionnelle de l'apoptose par les homologues Bcl-2.....	22
3.3 Anoïkose.....	23

3.3.1 Contrôle de la survie par les intégrines.....	24
3.3.2 Signalisation et anoïkose.....	25
3.3.2.1 Kinases MAP p38.....	27
4. DYSTROPHIES MUSCULAIRES CONGÉNITALES À DÉFICIENCE EN MÉROSINE.....	32
4.1 Effets de l'absence de mérosine sur l'intégrité des fibres musculaires	34
5. MODÈLES CELLULAIRES UTILISÉS.....	36
6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	39

II-MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE.....	42
2. TRANSFECTION DES C2C12.B4 AVEC LA SOUS-UNITÉ $\alpha 2$ DE LA MÉROSINE.....	43
3. INCUBATION AVEC LES DIFFÉRENTS INHIBITEURS.....	44
3.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés.....	45
4. MISE EN ÉVIDENCE DE L'APOPTOSE.....	48
4.1 Détection de la dégradation internucléosomique de l'ADN.....	48
4.2 TUNEL <i>in situ</i>	49
5. ISOLATION DES MYOTUBES.....	51
6. WESTERN BLOT.....	52
6.1 Solubilisation des protéines.....	52
6.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant.....	52
6.3 Immunodétection des protéines.....	53

6.3.1 Anticorps primaires utilisés.....	54
6.3.2 Anticorps secondaires utilisés.....	55
6.4 Déshybridation des membranes.....	56
7. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA TYROSINE KINASE FYN.....	56

III-RÉSULTATS

1. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src induit l'apoptose dans les cultures de cellules C2C12 différenciées.....	59
2. L'apoptose due à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src est spécifique aux myotubes.....	60
3. Les myoblastes et les myotubes montrent des niveaux d'expression différents des tyrosines kinases Fyn et Yes.....	62
4. L'activité des kinases MAP p38 est essentielle à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src.....	64
5. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src active les kinases MAP p38.....	68
6. L'activité des protéines kinases C n'est pas essentielle à la survie des cellules C2C12 différenciées.....	70
7. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 affecte les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 Bcl-X _L et Bcl-2 ainsi que de la protéine anti-apoptotique Bag-1.....	70
8. L'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes...	72
9. L'activité de la tyrosine kinase Fyn chute lors de l'anoïkose des myotubes...	76

10. L'expression des anti-apoptotiques Bcl-X _L , Bcl-2 et Bag-1 chute alors que celle du pro-apoptotique Bax augmente en absence de mérosine.....	78
--	----

IV-DISCUSSION

1. Les tyrosines kinases de la famille Src jouent un rôle critique et spécifique au niveau de la survie des myotubes.....	81
2. Les kinases MAP p38 sont essentielles à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src.....	84
3. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 affecte les niveaux d'expression des anti-apoptotiques Bcl-X _L , Bcl-2 et Bag-1.....	87
4. L'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes....	88
5. L'activité de la tyrosine kinase Fyn chute lors de l'anoïkose des myotubes...	89
6. L'expression des anti-apoptotiques Bcl-X _L , Bcl-2 et Bag-1 diminue alors que celle du pro-apoptotique Bax augmente en absence de mérosine.....	91

V-CONCLUSIONS.....	94
--------------------	----

REMERCIEMENTS.....	97
--------------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	98
--------------------	----

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I-INTRODUCTION

Figure 1. Structures macroscopique et microscopique du muscle squelettique.....	3
Figure 2. Intégrines et signalisation intracellulaires.....	12
Figure 3. Tyrosines kinases de la famille Src.....	15
Figure 4. Caractéristiques morphologiques et principaux acteurs de l'apoptose.....	18
Figure 5. Représentation schématique de la structure primaire et de la classification des homologues Bcl-2.....	21
Figure 6. Intégrines et survie cellulaire.....	26
Figure 7. Voies de signalisation activées lors de l'anoïkose.....	28
Figure 8. Représentation schématique de la voie des kinases MAP p38.....	30
Figure 9. Effets de l'absence de mérosine sur l'intégrité des fibres musculaires....	37
Figure 10. Modèles cellulaires utilisés.....	41

III-RÉSULTATS

Figure 11. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src induit l'apoptose des cellules C2C12 différenciées.....	61
Figure 12. L'apoptose due à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src est spécifique aux myotubes.....	63
Figure 13. Les myoblastes et les myotubes montrent des niveaux d'expression différents des tyrosines kinases Fyn et Yes.....	65

Figure 14. Les kinases MAP p38 sont nécessaires à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src.....	67
Figure 15. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src active les kinases MAP p38 dans les myotubes.....	69
Figure 16. L'activité des protéines kinases C n'est pas essentielle à la survie des C2C12 différenciées.....	71
Figure 17. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 affecte les niveaux d'expression de Bcl-X _L , Bcl-2 et Bag-1	73
Figure 18. L'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes.....	75
Figure 19. L'activité de la tyrosine kinase Fyn chute lors de l'anoïkose des myotubes.....	77
Figure 20. L'expression des anti-apoptotiques Bcl-X _L , Bcl-2 et Bag-1 chute alors que celle du pro-apoptotique Bax augmente en absence de mérosine.....	80

IV-DISCUSSION

Figure 21. Modèle proposé.....	95
--------------------------------	----

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Note : Comme dans la littérature en général, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste des abréviations, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèse) dans le but de montrer la provenance de l'acronyme.

APAF-1	Facteur d'activation des protéases apoptotiques-1 (apoptotic protease-activating factor-1)
ASK-1	Kinase régulant l'apoptose (apoptosis-regulating kinase)
ATP	Adénosine triphosphate
BH	Homologie à Bcl-2 (Bcl-2 homology)
Cav	Cavéoline
CHO	Cellules d'ovaire d'hamster chinois (chinese hamster ovary cells)
CMV	Cytomegalovirus
Cont.	Cellules contrôles non-traitées
Cyto.D	Cytochalasine D
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dUTP	Désoxyuridine triphosphate
ECL	Enhance chemiluminescence
EDTA	Ethylène diamine tétra acide acétique
ERK	Kinases régulées par des facteurs extracellulaires (extracellular-regulated kinase)
FAK	Kinase d'adhésion focale (focal adhesion kinase)
GFX	GF109203X
Go	Go6983

Herb.A	Herbimycine A
hsp-27	Protéine du choc thermique-27 (heat shock protein-27)
Indo.	Indométacine
JNK	Kinases du domaine NH2-terminal de c-Jun (c-Jun NH2-terminal kinase)
Ly	Ly 294002
MAP kinase	Kinases activées par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase)
MAPKAPK	Protéine kinase activée par les MAP kinase (MAP kinase-activated protein kinase)
μCi	Micro-Curie
MCMD	Dystrophies musculaires congénitales à déficience en mérosine (merosin-deficient congenital muscular dystrophy)
MEKK-1	MAP kinase/ERK kinase kinase-1
MKK	MAP kinase kinase
MKP-1	MAP kinase phosphatase-1
MLK	Mixed lineage kinase
MnCl ₂	Chlorure de manganèse
NaCl	Chlorure de sodium
NaF	Fluorure de sodium
ND	Myoblastes non différenciés
nm	Nanomètre
PARP	Poly adénosinediphosphate-ribose polymérase
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffer saline)
PD	PD 98059

PI-3 kinase	Phosphatidylinositol 3'-OH kinase
PKC	Protéine kinase C
Rap.	Rapamycine
Rpm	Révolutions par minute
RSV	Virus du sarcome de Rous (Rous sarcoma virus)
SB	SB 202190
SDS	Sodium dodecyl sulfate
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
SH	Homologie à Src (Src homology)
TdT	Terminal désoxynucléotidyl transférase
TE	Tris-EDTA
TGY	Thréonine-glycine-tyrosine
TKs Src	Tyrosines kinases de la famille Src
TM	Transmembranaire
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α)
TUNEL	Marquage des cassures d'ADN par le dUTP médié par la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP mediated nick end labelling)

RÉSUMÉ

Dans la dystrophie musculaire congénitale à déficience en mérosine (MCMD), l'absence de mérosine dans la lame basale des fibres musculaires cause l'anoïkose myogénique. Cependant, l'absence de mérosine n'affecte pas la survie des myoblastes indifférenciés. L'intégrine $\alpha 7\beta 1$ D est le récepteur fonctionnel de la mérosine responsable de la transmission des signaux de survie chez les fibres musculaires. Donc, étant donné que le système d'adhésion cellulaire $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine joue un rôle critique et spécifique au niveau de la survie des myotubes, nous avons émis l'hypothèse que ce dernier génère une signalisation spécifiquement impliquée dans la survie des myotubes. À l'inverse, l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine pourrait engendrer des voies de signalisation responsables de l'induction de l'anoïkose. Dans la présente étude, nous avons donc voulu déterminer 1) les voies de signalisation, activées par le système d'adhésion $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, responsables de la survie des myotubes, 2) les voies de signalisation, activées lors de la perte du lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, impliquées dans l'anoïkose des myotubes et (3) les mécanismes moléculaires de régulation de l'anoïkose des myotubes en étudiant la modulation des niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques en absence de mérosine.

À l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques chez les cellules C2C12 (capables de différenciation myogénique), nous avons d'abord démontré que, de toutes les voies étudiées, seules les tyrosines kinases de la famille Src sont cruciales pour la survie des myotubes. Par contre, la survie des myoblastes n'est pas affectée par l'inhibition des tyrosines kinases Src. De plus, nous avons démontré que l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src est inhibée de façon dose dépendante par le SB 202190, un inhibiteur des kinases MAP p38. Donc, les kinases MAP p38 possèdent un rôle important au niveau de l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src. Par la suite, dans le but de comprendre comment les kinases Src et les kinases MAP p38 modulent l'apoptose, nous avons étudié les niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 lors de l'inhibition de ces voies. Notre étude révèle que l'inhibition des kinases Src est accompagnée d'une baisse d'expression de Bcl-X_L et de Bag-1, tandis qu'une hausse d'expression de Bcl-2 est observée lors de l'inhibition des kinases MAP p38.

Dans un deuxième temps, nous avons répondu plus spécifiquement à nos objectifs en démontrant que les tyrosines kinases Src et les kinases MAP p38 sont également impliquées dans l'anoïkose due à l'altération du lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine. En effet, l'anoïkose induite par un anticorps bloquant la sous-unité $\beta 1$ des intégrines ou par l'absence de mérosine (chez le clone myogénique C2C12.B4/plam n'exprimant pas la mérosine) est inhibée par le SB 202190. L'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine est également accompagnée d'une baisse importante de l'activité de Fyn, un membre de la famille des tyrosines kinases Src exprimé au cours de la différenciation myogénique. Étant donné que les tyrosines kinases de la famille Src sont cruciales pour la survie des myotubes, cette baisse d'activité de Fyn pourrait bien être à la base

de l'anoïkose des myotubes. L'absence de mérosine module les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 de façon similaire, mais plus complexe, à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. En effet, en absence de mérosine nous observons une baisse d'expression de Bcl-X_L, de Bcl-2 et Bag-1 couplée à une hausse d'expression de Bax.

Notre étude a donc permis de démontrer que la tyrosine kinase Fyn pourrait transmettre les signaux de survie conférés par le système d'adhésion $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine. Nous avons également clairement établi que les MAP kinases p38 sont essentielles à l'anoïkose due à l'altération du système d'adhésion $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine. De plus, nous avons commencé à élucider les mécanismes d'induction de l'anoïkose en étudiant les modulations d'expression de certains homologues Bcl-2 en absence de mérosine. Toutes ces informations seront très pertinentes dans la compréhension et le contrôle de l'anoïkose due à l'absence de mérosine qui joue un rôle important dans la progression de la MCMD.

I – INTRODUCTION

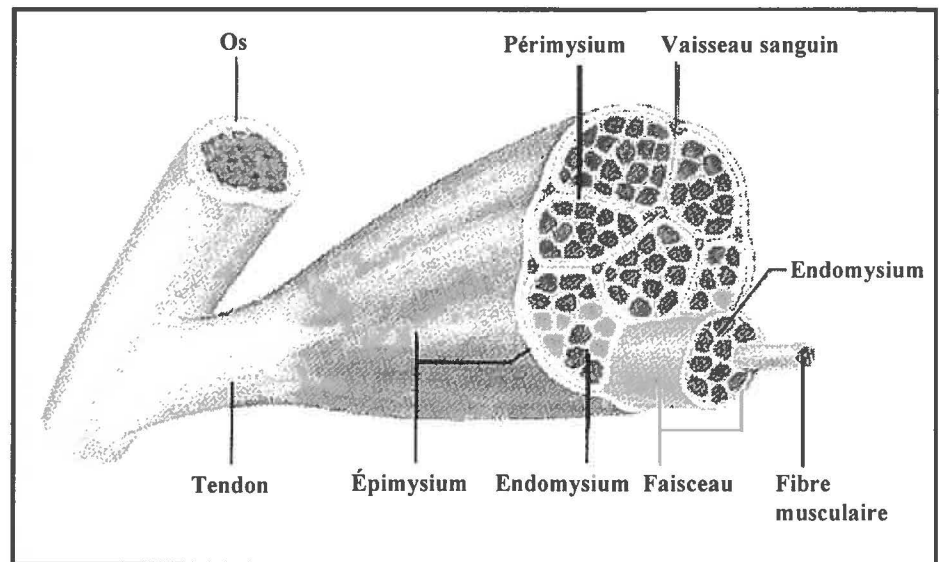
1. Muscle squelettique

Le muscle squelettique, tissu qui recouvre le squelette et s'y attache, est responsable des mouvements volontaires de l'organisme. Ainsi, il permet la locomotion, la manipulation et la réaction aux événements environnementaux. En second lieu, le muscle squelettique permet, grâce à des ajustements infimes, le maintien de la posture et la stabilisation des articulations de l'organisme. Finalement, le muscle squelettique permet le maintien d'une température corporelle adéquate. Chaque muscle squelettique constitue un organe bien défini principalement composé de fibres musculaires (cellules musculaires). La structure macroscopique d'un muscle squelettique s'apparente à celle d'une poupée russe où une série de structures semblables, mais de tailles différentes, s'emboîtent les unes dans les autres pour former un tout. Ainsi, chaque fibre musculaire est entourée d'une gaine de tissu conjonctif mince appelée endomysium. Plusieurs fibres et leur endomysium sont regroupées en faisceaux délimités par une autre gaine de tissu conjonctif nommée périmysium. Finalement, l'épimysium regroupe l'ensemble des faisceaux composant le muscle. Toutes ces gaines forment un ensemble en continuité avec le tendon qui sert de pont entre le muscle et l'os. Les différents niveaux d'organisation du muscle squelettique sont présentés à la figure 1A.

Les fibres musculaires squelettiques sont de longues cellules cylindriques polynucléées (Fig. 1B). Chacune d'elle est en fait un syncytium résultant de la fusion d'un nombre important de cellules souches, appelées myoblastes, au cours de l'ontogenèse du muscle squelettique. L'ontogenèse du muscle squelettique débute par la prolifération et la migration des myoblastes primaires vers les sites des futurs muscles squelettiques. Une fois à destination, les myoblastes primaires fusionnent pour générer les myotubes polynucléés primaires. Par la suite, les myotubes secondaires sont formés par l'alignement et la fusion des myoblastes secondaires avec les myotubes primaires. Finalement, les myotubes secondaires se spécialisent en fibres musculaires matures et contractiles. Il est possible d'obtenir des myotubes polynucléés *in vitro* grâce à certaines lignées cellulaires établies capables de différenciation myogénique (discuté plus en détail à la section 5). Le sarcoplasme (cytoplasme) d'une fibre musculaire est occupé en grande partie par les myofibrilles. Celles-ci sont des structures cytosquelettiques spécialisées permettant la contraction musculaire. La régénération du muscle squelettique est possible grâce à la présence de cellules satellites dans le muscle adulte. Les cellules satellites sont mononucléées, normalement quiescentes et localisées entre la lame basale et le sarcolemme (membrane plasmique) des fibres musculaires. Le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules satellites est critique pour le maintien de l'homéostasie et la réparation du tissu musculaire.

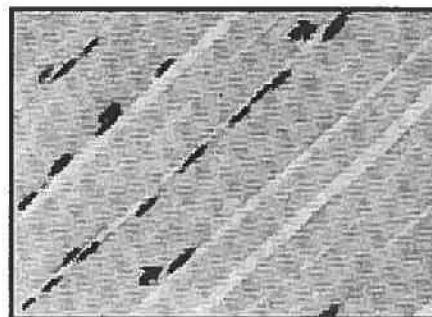
Figure 1. Structure macroscopique et microscopique du muscle squelettique. (A) Schéma représentant la structure et les niveaux d'organisation du muscle squelettique. Au sein d'un muscle squelettique, chaque fibre musculaire est revêtue d'une gaine de tissu conjonctif appelée endomysium. Les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux qui sont délimités par une gaine de tissu conjonctif plus épaisse nommée périmysium. L'ensemble du muscle est recouvert par l'épimysium, une gaine de tissu conjonctif qui délimite et renforce le muscle. Le tendon crée un lien indirecte entre le muscle et l'os. (B) Photomicrographie d'une coupe longitudinale de muscle squelettique montrant des sections de fibres musculaires. Les fibres musculaires sont des cellules très allongées possédant de nombreux noyaux situés en périphérie.

A



Marieb, 1993

B



Xu et al., 1994

2. Adhésion cellulaire

Au sein d'un tissu, la cohésion est assurée par les liens intercellulaires et par les liens établis entre les cellules et un réseau complexe de macromolécules extracellulaires : la matrice extracellulaire. Cependant, la matrice extracellulaire n'a pas pour seule fonction d'assurer la cohésion et l'architecture tissulaire. En effet, elle influence une gamme étendue de processus cellulaires cruciaux tels la migration, la prolifération, la différenciation et la survie.

Selon le type de macromolécule matricielle, leur quantité relative et leur mode d'organisation, une quantité importante de matrices extracellulaires différentes peuvent être assemblées. Chaque matrice extracellulaire est adaptée au besoin du tissu qui la produit. Les différentes matrices extracellulaires peuvent être subdivisées en deux groupes principaux, à savoir les matrices interstitielles des tissus conjonctifs et les lames basales. Dans le premier cas, la matrice se trouve en abondance et entoure les cellules. Ce type de matrice est déterminant pour les propriétés physiques (élasticité, rigidité) du tissu concerné. Pour leur part, les lames basales sont des matrices extracellulaires spécialisées qui se présentent sous forme d'un mince réseau flexible et résistant. Elles séparent les feuillets épithéliaux, les cellules endothéliales, les cellules de Schawn et les fibres musculaires des tissus voisins. Les lames basales sont principalement composées de collagène de type IV, de perlécan, de nidogène et de laminines.

2.1 Laminines

Les laminines jouent un rôle clé dans l'activité biologique et fonctionnelle des lames basales. Elles influencent entre autres la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques constituées d'une sous-unité α , d'une sous-unité β et d'une sous-unité γ . Les sous-unités sont homologues, mais proviennent de gènes différents (Wewer et Engvall, 1994). À ce jour, cinq sous-unités α , trois sous-unités β et trois sous-unités γ sont connues et peuvent s'associer pour former un total de douze laminines différentes (Wewer et Engvall, 1994 ; Gullberg et al., 1999). L'expression des différentes sous-unités est régulisée de façon spatio-temporelle. C'est donc dire que l'expression d'une laminine hétérotrimérique donnée peut être restreinte à certains tissus et à certains stades du développement (Engvall et al., 1990 ; Engvall, 1993). L'association des sous-unités α , β et γ forme une structure en croix composée de trois bras courts et un bras long. Une fois l'hétérotrimère assemblé, la structure est stabilisée par la formation de ponts disulfures (Engvall et Wewer, 1996).

2.2 Lame basale des fibres musculaires

La lame basale entourant les fibres musculaires squelettiques présente trois sous-domaines spécialisés : la lame basale sub-sarcolemmale, qui enveloppe la majeure partie de la fibre musculaire, la jonction neuromusculaire et la jonction

myotendineuse. Au cours du développement, la lame basale du muscle squelettique contient les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ des laminines (Sanes et al., 1986 ; Schuler et Sorokin, 1995). Cependant, l'expression des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ sont transitoires (Patton et al., 1997 ; Sorokin et al., 1997). Dans le muscle adulte, la sous-unité $\alpha 2$ s'associe avec les sous-unités $\beta 1$ et $\gamma 1$ au pourtour de la fibre. La laminine-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) est donc la laminine majeure de la lame basale des fibres musculaires. Cependant, les laminines-4 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$), -9 ($\alpha 4\beta 2\gamma 1$) et -11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$) sont présentes à la jonction neuromusculaire (Patton et al., 1998), tandis qu'à la jonction myotendineuse on retrouve uniquement la laminine-4 (Engvall et al., 1990). Les laminine-2 et -4, qui possèdent toutes deux la sous-unité $\alpha 2$, sont conjointement appelées mérosine. Les myoblastes diffèrent des fibres musculaires à l'égard de l'expression des laminines. En effet, les myoblastes expriment et adhèrent aux laminine-1 et -2 (Kühl et al., 1982 ; Schuler et Sorokin, 1995 ; Vachon et al., 1996). *In vitro*, l'expression de la mérosine augmente au cours de la différenciation myogénique (Vachon et al., 1996) de sorte que la laminine-1 est principalement associée aux myoblastes (Kühl et al., 1982 ; Kroll et al., 1994 ; Schuler et Sorokin, 1995 ; Vachon et al., 1996), alors que la mérosine est fortement concentrée au pourtour des myotubes (Vachon et al., 1996).

2.3 Intégrines : récepteurs membranaires majeurs des laminines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α liée de façon non-covalente à une

sous-unité β (Hynes, 1992). À ce jour, dix-sept sous-unités α et huit sous-unités β , capables de former vingt-trois récepteurs différents, ont été caractérisées. La complexité est accentuée par l'existence d'épissage alternatif de certaines des sous-unités α et β (de Melker et Sonnenberg, 1999). Chaque hétérodimère possède des propriétés de liaison et de signalisation qui lui est propre (Giancotti et Ruoslahti, 1999). À l'instar des laminines, les différentes intégrines exhibent une distribution tissulaire et développementale différentielle (Adams et Watt, 1993 ; Rosekelly et al., 1995). Les intégrines sont reconnues comme étant les principaux récepteurs des protéines de la matrice extracellulaire (Hynes, 1992). Cette fonction est principalement accomplie par les intégrines possédant la sous-unité $\beta 1$ ou $\beta 4$.

Les intégrines participent aux deux grandes fonctions de la matrice extracellulaire. Dans un premier temps, les intégrines sont impliquées dans l'adhésion cellulaire et la cohésion tissulaire en créant un lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Burridge et al., 1988 ; Hynes, 1992). En second lieu, les intégrines peuvent médier les rôles biologiques de la matrice extracellulaire en initiant des voies de signalisation intracellulaires qui vont influencer la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Kumar, 1998 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999) (la signalisation par les intégrines sera abordée plus en détail à la section 2.3.2)

2..3.1 Intégrines exprimées par les fibres musculaires squelettiques

Au cours de l'ontogenèse du muscle squelettique, les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ et αv sont abondamment exprimées chez les myoblastes (Bronner-Fraser et al., 1992 ; Duband et al., 1992 ; Enomoto et al., 1993 ; McDonald et al., 1995). Par contre, leur expression est perdue au niveau des fibres musculaires matures. Pour sa part, la sous-unité $\alpha 7$ est exprimée tant au niveau des myoblastes que des fibres musculaires matures (Bao et al., 1993). La même observation est faite en ce qui concerne la sous-unité $\beta 1$. Donc, l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ est la principale, sinon la seule, intégrine liant la laminine exprimée par les fibres musculaires (Song et al., 1993 ; Hodges et Kaufman, 1996).

Il existe plusieurs formes de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ issues de l'épissage alternatif des ARNm des sous-unités $\alpha 7$ et $\beta 1$ (Burkin et Kaufman, 1999 ; de Melker et Sonnerberg, 1999). Le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\alpha 7$ peut être épissé alternativement de trois façons, générant ainsi les formes $\alpha 7A$, $\alpha 7B$ et $\alpha 7C$. La sous-unité $\alpha 7B$ est exprimée dans les myoblastes secondaires et dans les fibres musculaires adultes. Elle est également retrouvée dans d'autres tissus tels le muscle cardiaque, l'épithélium intestinal, le trophoblaste, les vaisseaux sanguins et le tissu nerveux (Basora et al., 1997 ; Song et al., 1993 ; Sutherland et al., 1993). Les isoformes $\alpha 7A$ et C sont principalement exprimées dans le muscle squelettique (Burkin et Kaufman, 1999 ; Basora et al., 1997). La sous-unité $\alpha 7A$ est exprimée au cours de la différenciation myogénique et maintenue chez les fibres musculaires matures, alors que la sous-unité

$\alpha 7C$ apparaît seulement au niveau des fibres musculaires (Song et al., 1993). Le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 1$ exhibe également différentes formes d'épissages. L'isoforme $\beta 1A$, la plus commune des sous unités $\beta 1$, est retrouvée dans les myoblastes. Au cours de la différenciation myogénique, l'isoforme $\beta 1D$, spécifique aux muscles cardiaque et squelettique, remplace $\beta 1A$ (Belkin et al., 1996).

2.3.2 Signalisation par les intégrines

Les intégrines ont la capacité de transmettre des signaux à travers la membrane plasmique dans les deux directions (extracytoplasmique et intracytoplasmique). En effet, l'activité de liaison extracellulaire des intégrines peut être modulée de l'intérieur de la cellule, alors que la matrice extracellulaire peut transmettre des signaux intracellulaires via les intégrines (Williams et al., 1994 ; Clark et Brugge 1995). Ce deuxième aspect sera traité plus en détail dans la présente section.

Le domaine cytoplasmique des intégrines est généralement court et dépourvu d'activité enzymatique (Hynes, 1992 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999). Les intégrines transmettent donc leurs signaux via l'interaction avec des protéines du cytosquelette et des kinases cytoplasmiques. Par conséquent, les intégrines peuvent engendrer des réorganisations majeures du cytosquelette et des cascades de signalisation intracellulaires ; deux événements intimement liés (Giancotti et Ruoslahti, 1999). Lorsque les intégrines lient un constituant de la matrice extracellulaire, elles se

regroupent en des points de contact appelés plaques d'adhésion focalisées (Burridge et Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Ce regroupement des intégrines permet, en association avec des protéines du cytosquelette et des kinases, l'assemblage des microfilaments d'actine en fibres de stress. Les plaques d'adhésion focalisées permettent également de concentrer certaines kinases et servent ainsi de carrefour de signalisation par les intégrines (Burridge et Chrzanowska-Wodnicka, 1996 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase FAK («focal adhesion kinase») est un événement précoce qui survient suite à la liaison de la plupart des intégrines (Giancotti et Ruoslahti, 1999). La FAK est directement recrutée par le domaine cytoplasmique de la sous-unité β ou indirectement via des protéines du cytosquelette telles la taline et la paxilline (Kumar, 1998 ; Schaeffer et Hunter, 1998). Suite à son activation, la FAK s'auto-phosphoryle sur la tyrosine 397. Cette auto-phosphorylation crée un site de liaison pour le domaine SH2 de certaines tyrosines kinases de la famille Src, soit p60^{c-Src} et Fyn (Schaller et al., 1994 ; Schlaepfer et al., 1994) (les tyrosines kinases de la famille Src sont présentées plus en détail à la section 2.3.2.1). Les kinases Src phosphorylent alors des composantes des plaques d'adhésion focalisées et des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire (Richardson et Parson, 1996 ; Vuori et al., 1996 ; Schlaepfer et al., 1997). La FAK peut également activer la phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI-3 kinase) de façon Src dépendante ou indépendante (Chen et al., 1996). Il existe également des évidences que Src peut phosphoryler FAK sur le résidu tyrosine 925, créant ainsi un site

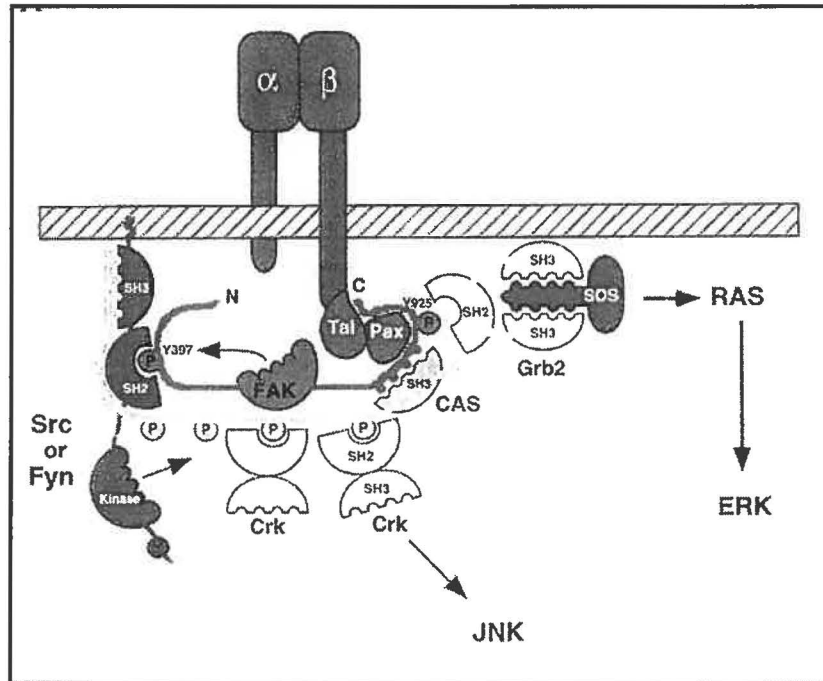
d'interaction pour le complexe Grb-2/mSOS (Schlaepfer et al., 1994) (Fig. 2A). Cette interaction relie donc FAK à la voie des kinases MAP ERK-1 et -2 (ERKs) (section 3.3.2.1), puisque ce complexe est responsable de l'activation de Ras qui se trouve en amont de celles-ci (Fig. 2A). Certaines intégrines $\beta 1$ peuvent également activer les kinases MAP ERKs via la tyrosine kinase Fyn en faisant intervenir la protéine adaptatrice Shc en amont du complexe Grb-2/mSOS. Dans ce cas, la cavéoline-1 sert d'intermédiaire entre Fyn et la sous-unité α de l'intégrine concernée (Wary et al., 1998) (Fig. 2B).

2.3.2.1 Tyrosines kinases de la famille Src

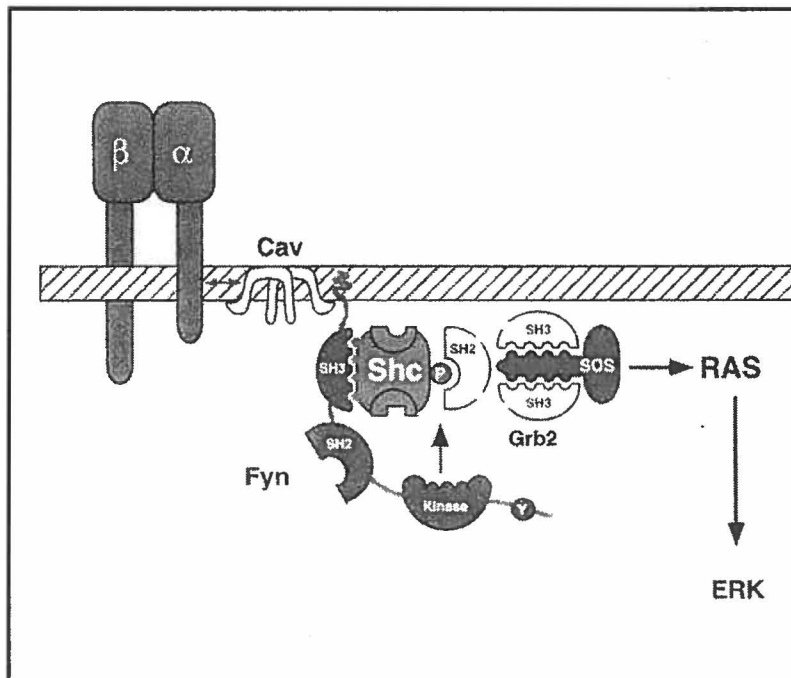
Les tyrosines kinases de la famille Src occupent un rôle de premier plan dans la signalisation par les intégrines (Fig. 2). Cette famille de kinase compte plus de dix membres partageant des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leurs fonctions. Selon leur distribution tissulaire, les tyrosines kinases de la famille Src sont subdivisées en trois sous-familles. Premièrement, les kinases $p60^{c-Src}$, Fyn et Yes, constituant la première sous-famille, sont exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme (Brown et Cooper 1996). Pour leur part, les membres de la sous-famille Lyn (Lyn, Hck, Fgr, Blk et Lck) sont principalement exprimés au niveau des tissus hématopoïétiques (Bolen et Brugge, 1997). Finalement, Frk/Rak et Iyk/Bsk sont surtout retrouvées dans les tissus épithéliaux (Lee et al., 1994 ; Oberg-Welsh et Welsh, 1995).

Figure 2. Intégrines et signalisation intracellulaire. Schéma représentant les étapes précoces de la signalisation par les intégrines. Les étapes précoces de la signalisation par les intégrines impliquent très souvent des tyrosines kinases de la famille Src. Celles-ci peuvent être recrutées par l'intermédiaire de la tyrosine kinase FAK (A) ou via la cavéoline-1 (Cav) (B). Par la suite, une foule de voies de signalisation peuvent être activées. Par exemple, la voie des kinases MAP ERKs via le recrutement et l'activation du complexe Grb2-SOS. Lorsque le recrutement de Fyn se fait via la cavéoline-1, le recrutement de complexe Grb-2 SOS est dépendant de la protéine adaptatrice Shc. La voie des kinases MAP JNKs peut également être activée par les intégrines par l'intermédiaire des protéines CAS et Crk. Abréviations : α = sous-unité α , β = sous-unité β , N = NH₂ terminal, C = COOH-terminal, Y = tyrosine, P = Phosphotyrosine, SH = «Src homology», Tal = taline, Pax = Paxiline.

A



B



Giancotti et Ruoslahti, 1999

Tel que mentionné précédemment, les tyrosines kinases de la famille Src possèdent un certain degré d'homologie dans leur séquence. Ces régions d'homologies définissent cinq domaines fonctionnels : le domaine SH4 (Src homology 4), le domaine SH3, le domaine SH2, le domaine catalytique et un domaine de régulation négative contenant un résidu tyrosine hautement conservé (figure 3). Le domaine SH4 contient un site de palmylation et/ou un site de myristoylation selon la tyrosine kinase Src concernée. Ces modifications post-traductionnelles permettent l'ancrage des tyrosines kinases Src à différents sous-domaines de la membrane plasmique tels les cavéolae et les plaques d'adhésion focalisées (Kaplan et al., 1994 ; Robbins et al., 1995). Le domaine SH3 permet l'interaction avec une courte séquence continue riche en proline, tandis que le domaine SH2 interagit avec une courte séquence d'acides aminés contenant une phosphotyrosine. Les domaines SH2 et SH3 des tyrosines kinases Src sont importants au niveau des interactions inter- et intramoléculaires. Ces domaines régularisent ainsi la localisation des tyrosines kinases Src, le recrutement des substrats et l'activité catalytique de ces kinases. Pour sa part, le domaine catalytique est responsable de la phosphorylation sur résidus tyrosines des différents substrats. Finalement, le résidu tyrosine conservé en C-terminal est impliqué dans la régulation de l'activité catalytique des tyrosines kinases Src.

Les tyrosines kinases Src peuvent régulariser une gamme étendue de processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la prolifération, la réorganisation du cytosquelette, la différenciation et la survie. Ce large spectre d'activité est une conséquence de l'association de ces kinases avec diverses classes de récepteurs

cellulaires et de la phosphorylation de nombreux substrats. Par exemple, les tyrosines kinases Src peuvent être activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase (Luttrell et al., 1988), par des récepteurs couplés aux protéines G (Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1996) et par les intégrines (Hirst et al., 1986) (section 2.3.2). Suite à leur activation, les tyrosines kinases Src peuvent phosphoryler plus de vingt-cinq substrats différents. Parmi ceux-ci, on retrouve des protéines associées au cytosquelette (tensine, vinculine, taline), des kinases (PI-3 kinase, FAK, RasGAP), des phosphatases (SHP2), des protéines structurales (cavéoline) et des protéines adaptatrices (Shc) (Brown et Cooper, 1996).

2.4 Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

Les fibres musculaires peuvent également adhérer à leur lame basale via le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAG). Le DAG crée un lien indirect entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ce lien est d'une grande importance pour la stabilité mécanique des fibres musculaires. La composante cytoplasmique du DAG est la dystrophine, une protéine qui effectue le pont entre le cytosquelette des fibres musculaires et les autres composantes du DAG. Le complexe dystroglycan constitue la principale composante transmembranaire du DAG. Il est composé de deux sous-unités (α et β) issues d'un polypeptide commun (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). L' α -dystroglycan est une glycoprotéine membranaire périphérique associée de façon non-covalente au β -dystroglycan, une protéine

Figure 3. Tyrosines kinases de la famille Src. Représentation schématique de la structure primaire des tyrosines kinases de la famille Src. Le domaine SH4 («Src homology»), situé en N-terminal, est impliqué dans la localisation membranaire des tyrosines kinases de la famille Src, les domaines SH2 et SH3 sont important au niveau des interactions inter- et intra-moléculaires régulant ainsi l'activation et l'activité des tyrosines kinases Src, le domaine catalytique est responsable de la phosphorylation sur résidus tyrosines et finalement la tyrosine (Y) en C-terminal est importante pour la régulation de l'activité des tyrosines kinases Src.



transmembranaire. Le complexe dystroglycan peut lier la mérosine via la sous unité α , tandis que la sous unité β est directement liée à la dystrophine. Le dystroglycan s'associe également avec les sarcoglycans (α , β , γ et δ). Les sarcoglycans sont des protéines transmembranaires, faisant partie du DAG, qui pourraient être impliquées dans la stabilisation du dystroglycan. En effet, la perte d'expression de l' α ou du δ -sarcoglycan affecte également le niveau de dystroglycan présent au sarcolemme (Campbell, 1995).

3. Apoptose

3.1 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée. Elle permet l'élimination de cellules endommagées, surnuméraires ou potentiellement dangereuses pour l'organisme. Par conséquent, l'apoptose est un processus essentiel au développement et au maintien tissulaire. L'apoptose est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une vacuolisation membranaire, une condensation de la chromatine, une dégradation de l'ADN dans les régions internucléosomiques, un désassemblage d'organites cellulaires et une fragmentation nucléaire (Fig. 4A). Toutes ces étapes sont suivies par la formation de corpuscules apoptotiques. Ceux-ci renferment le contenu cellulaire réduit à sa plus simple expression. L'élimination de

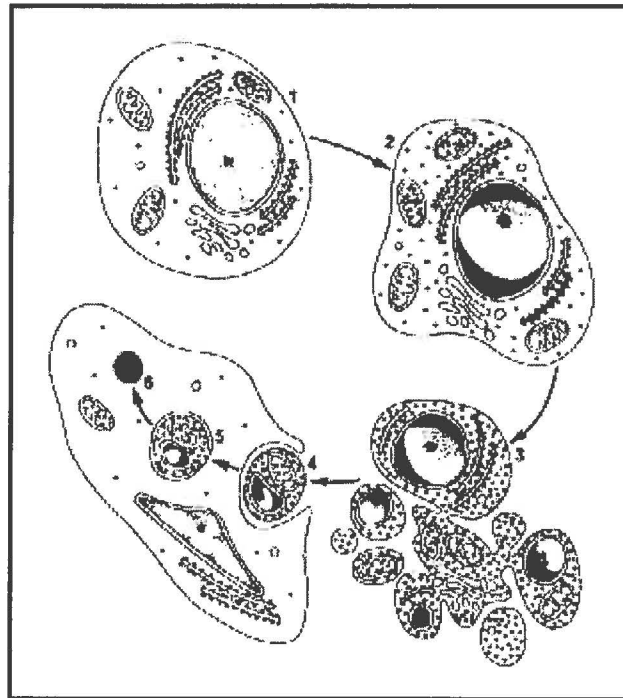
la cellule apoptotique se concrétise par la phagocytose des corpuscules apoptotiques par les macrophages et/ou par les cellules avoisinantes (Fig. 4A).

3.2 Principaux acteurs de l'apoptose

Les particularités de l'apoptose découlent d'un programme génétique conservé et étroitement régularisé (Ellis et al., 1991). L'apoptose est donc inhérente à chaque cellule et se manifeste suite à certains stimuli tels les agents génotoxiques (oxydants, irradiations), les toxines, les infections virales, ainsi que les chocs thermiques et osmotiques (Saini et Walker, 1998). L'absence de signaux de survie déclenche également l'apoptose. Par conséquent, la survie cellulaire n'est pas un processus passif. Au contraire, elle demande une constante activation conférée par certaines hormones (Wu et al., 1995), cytokines (Wallen et al., 1991), facteurs de croissance (Xia et al., 1995) et l'adhésion cellulaire (Frish et Francis, 1994). Paradoxalement, l'apoptose peut également être induite par certaines hormones et cytokines selon le type cellulaire étudié (Saini et Walker, 1998). La survie cellulaire sera donc le résultat de l'intégration de tous les signaux anti- et pro-apoptotiques qui afflux simultanément vers la cellule (Fig. 4B). Cette intégration se fait principalement par une famille de protéines apparentées appelée homologues Bcl-2. Par conséquent, les homologues Bcl-2 sont responsables de la phase décisionnelle de l'apoptose. Une fois qu'une cellule est vouée à l'apoptose, il y a activation d'une famille de protéases à haute spécificité nommées caspases. Leur activité protéolytique est responsable du

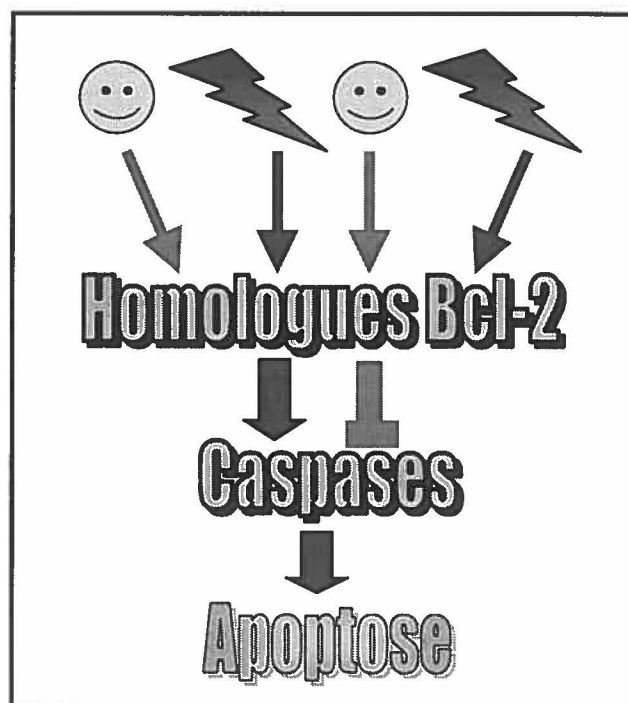
Figure 4. Caractéristiques morphologiques et principaux acteurs de l'apoptose. (A) Schéma représentant les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. Au cours de l'apoptose, la cellule subit différents changements morphologiques caractéristiques. Suite à ces changements morphologiques, la cellule se fragmente en corpuscules apoptotiques. L'élimination de la cellule apoptotique se concrétise par la phagocytose des corpuscules apoptotiques par les macrophages et/ou les cellules avoisinantes. (B) Schéma représentant les principales étapes de l'apoptose. La survie cellulaire dépend de l'intégration continue des signaux anti- et pro-apoptotiques affluant à la cellule. Cette intégration est principalement faite par les homologues Bcl-2. Une fois que la décision d'entrer en apoptose est prise, il y a activation irréversible des caspases. Leur activité protéolytique est responsable du démantèlement cellulaire caractéristique de l'apoptose.

A



Saini et Walker, 1998

B



☺ = Signaux anti-apoptotiques

⚡ = Signaux pro-apoptotiques

démantèlement cellulaire observé au cours de l'apoptose. C'est donc dire que les caspases sont responsables de la phase effectrice de l'apoptose (Fig. 4B).

3.2.1 Homologues Bcl-2 ; à la frontière entre la survie et la mort cellulaire.

Les homologues Bcl-2 constituent une famille de protéines structurellement apparentées qui intègrent les signaux pro- et anti-apoptotiques. Ils exercent donc un rôle crucial dans la phase décisionnelle de l'apoptose.

Jusqu'à présent, au moins quinze membres ont été identifiés chez les mammifères (Adams et Cory, 1998). Les homologues Bcl-2 comptent dans leur rang des membres anti-apoptotiques (par exemples Bcl-2 et Bcl-X_L) et pro-apoptotiques (par exemples Bax, Bak et Bad) (Fig. 5). La séquence polypeptidique de chaque homologue Bcl-2 possède au moins un des quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à BH4). Les homologues Bcl-2 sont subdivisés en sous famille selon les domaines BH contenus dans leur séquence. Les anti-apoptotiques de la sous-famille Bcl-2 contiennent les domaines BH1 à BH4, tandis que les autres anti-apoptotiques contiennent au minimum les domaines BH1 et BH2 (Adams et Cory, 1998) (Fig. 5A). Du côté des pro-apoptotiques, les membres de la sous famille Bax contiennent les domaines BH1, BH2 et BH3, tandis que les autres possèdent uniquement le domaine BH3 (Fig. 5B). Plusieurs homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques possèdent également un domaine transmembranaire en C-terminal qui permet l'ancrage à

différentes membranes intracellulaires telles la membrane mitochondriale externe, la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire (Krajewski et al., 1993) (figure 5A et B).

Les interactions protéine-protéine sont importantes dans la régulation des fonctions des homologues Bcl-2. Ce concept a été proposé suite à la mise en évidence de l'hétérodimérisation de Bcl-2 et Bax (Oltvai et al., 1993). Par la suite, une série d'autres hétérodimérisations et homodimérisations ont été rapportées. Les différentes homo et hétérodimérisations entre homologues Bcl-2 mènent au titrage de certains membres et, par conséquent, de leur fonction. Par conséquent, les niveaux d'expression relatifs des homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques jouent un rôle déterminant dans le «être ou ne pas être» cellulaire. Selon les signaux que la cellule reçoit, la balance entre homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques peut être influencée de différentes façons. Premièrement, les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 peuvent être modulés au niveau de la transcription. Deuxièmement, certains homologues Bcl-2 peuvent subir un épissage protéolytique et/ou de l'ARNm. Par exemple, Bcl-X_L peut être clivé et converti en un fragment pro-apoptotique appelé Bcl-X_S (Fujita et al., 1998). Ce dernier peut également être généré par épissage alternatif de l'ARNm de Bcl-X_L (Boise et al., 1993). Finalement, la phosphorylation peut moduler la balance entre homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques. Par exemple, lorsque le pro-apoptotique Bad est phosphorylé sur résidu sérine, il est séquestré dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 et voué à la dégradation (Zha et al., 1996).

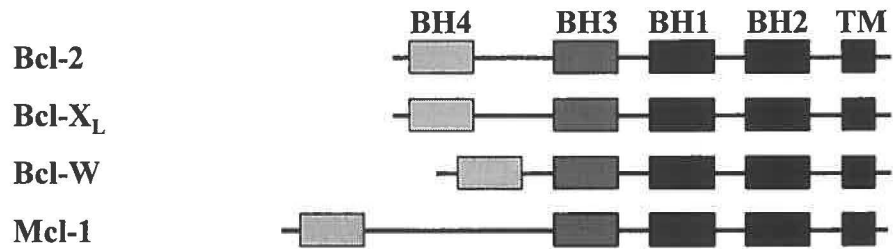
Figure 5. Représentation schématique de la structure primaire et de la classification des homologues Bcl-2. Les homologues Bcl-2 constituent une famille de protéine apparentées qui comprend des membres anti- et pro-apoptotiques. La séquence polypeptidique de chaque homologue Bcl-2 contient au moins un des quatre domaine d'homologie à Bcl-2 (BH1 à BH4). De plus, plusieurs homologues Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal. (A) Chez les mammifère, les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques sont subdivisées en deux sous-familles. Les membres de la sous-famille Bcl-2 contiennent les domaines BH1 à BH4, tandis que les autres anti-apoptotiques possèdent au moins les domaines BH1 et BH2. (B) Les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques sont également subdivisés en deux sous-familles. Les membres de la sous-famille Bax contiennent les domaines BH1 à BH3, tandis que les pro-apoptotiques ne possédant que le domaine BH-3 constituent la deuxième sous-famille.

A

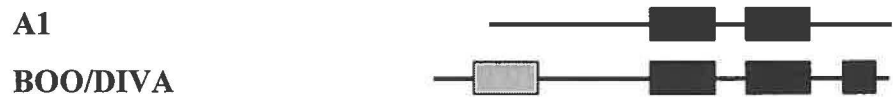
Anti-apoptotiques

Mammifères

Sous-famille Bcl-2



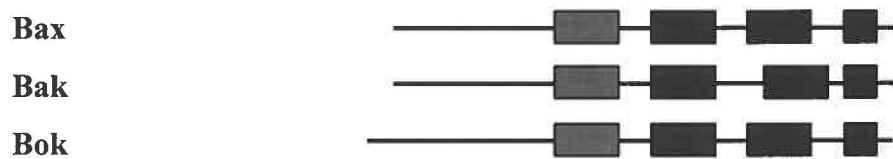
Autres

**B**

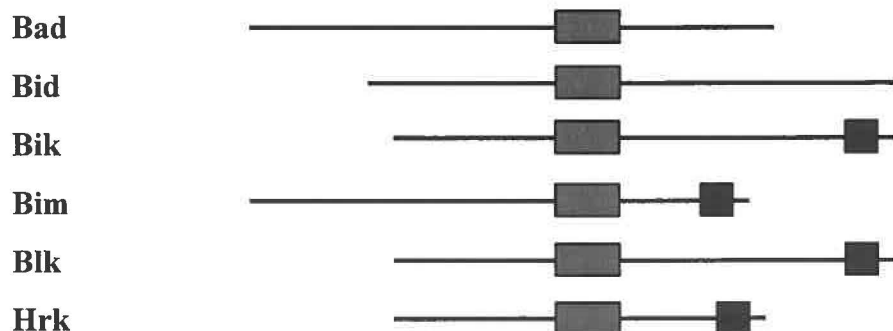
Pro-apoptotiques

Mammifères

Sous-famille Bax



Sous-famille BH3



L'activité de certains homologues Bcl-2 peut également être régulée par interaction avec des protéines non-homologues. Par exemple, Bcl-2 peut s'associer avec la protéine BAG-1 (Takayama et al., 1995). Par le recrutement et l'activation de la kinase Raf-1, cette association accentue l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Wang et al., 1996).

3.2.2 Contrôle de la phase décisionnelle de l'apoptose par les homologues Bcl-2

Le contrôle de l'entrée en apoptose par les homologues Bcl-2 réside principalement dans la régulation de l'assemblage d'un complexe cytoplasmique appelé apoptosome. L'apoptosome est essentiellement composé d'APAF-1 («apoptotic protease-activating factor-1») en association avec le dATP, le cytochrome *c* et un dimère de pro-caspases initiatrices (comme la pro-caspase-9) (Zou et al., 1999). La dimérisation des pro-caspases initiatrices au sein de l'apoptosome permet leur activation par autoclivage intermoléculaire. Les caspases initiatrices peuvent ensuite cliver et activer les caspases effectrices qui sont responsables du démantèlement cellulaire caractéristique de l'apoptose. La modulation de l'assemblage de l'apoptosome par les homologues Bcl-2 se fait principalement par séquestration et libération de composantes de l'apoptosome. Par exemple, l'anti-apoptotique Bcl-X_L peut lier et séquestrer APAF-1, prévenant ainsi la formation d'un apoptosome fonctionnel (Hu et al., 1998). Suite à un signal apoptotique, un pro-apoptotique, par exemple Bik, vient interagir avec Bcl-X_L et libérer APAF-1 (Zou et

al., 1997). Dans un deuxième temps, les homologues Bcl-2 peuvent moduler la libération du cytochrome *c*, une composante de l'apoptosome, qui se trouve normalement dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Muchmore et al., 1996 ; Vander Heiden et al., 1997). Ainsi, c'est donc principalement au niveau du contrôle de l'activité de la machinerie apoptotique que les homologues Bcl-2 exercent leurs fonctions régulatrices.

3.3 Anoïkose

Pour survivre, une cellule doit adhérer à sa matrice extracellulaire. En effet, la perte du lien cellule-matrice cause l'apoptose dans divers types cellulaires (Meredith et al., 1993 ; Frisch et Francis, 1994). Ce type particulier d'apoptose porte le nom d'anoïkose (mot grecque signifiant sans abri). La signalisation par les intégrines joue un rôle clé dans le maintien de la survie conféré par l'adhésion cellulaire. Bien que l'interaction intégrine-matrice extracellulaire soit requise pour la survie de façon générale, la survie d'un type cellulaire donné implique souvent un constituant de la matrice extracellulaire et une intégrine spécifique. Par exemple, les cellules épithéliales des glandes mammaires entrent en anoïkose lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène ou de fibronectine, mais elles survivent sur laminine ou sur une lame basale complète (Boudreau et al., 1995). De plus, des études effectuées chez les cellules CHO (chinese hamster ovary cells) cultivées sur une matrice de fibronectine indiquent que la surexpression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ supprime l'anoïkose,

tandis que la surexpression de l'intégrine $\alpha v \beta 1$ est sans effet à l'égard de la survie (Zhang et al., 1995). Ce mécanisme peut empêcher la colonisation d'un tissu par un type cellulaire étranger.

3.3.1 Contrôle de la survie par les intégrines

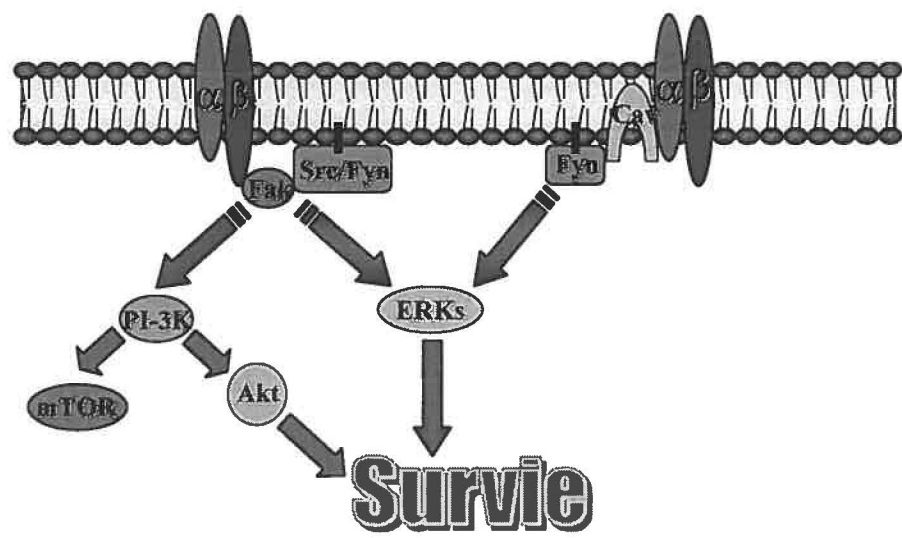
Tel qu'illustré à la figure 6, plusieurs voies de signalisation impliquées dans la survie peuvent être activées par l'adhésion cellulaire. La tyrosine kinase FAK semble jouer un rôle majeur dans la transmission des signaux de survie émis par les intégrines (Frisch et al., 1996 ; Ilic et al., 1998). En effet, l'utilisation d'un mutant constitutivement actif de FAK protège les cellules MDCK contre l'anoïkose (Frisch et al., 1996). Ce mutant possède une capacité accrue d'interaction avec les tyrosines kinases Src. Cependant, aucune évidence directe ne permet de relier les tyrosines kinases Src à la suppression de l'anoïkose jusqu'à présent. Cette promotion de la survie par la FAK pourrait impliquer l'activation de la kinase Akt qui s'effectue par l'intermédiaire de la PI-3 kinase (Khwaja et al., 1997). La kinase Akt est bien connue pour protéger la cellule contre l'apoptose en phosphorylant (et donc inactivant) le pro-apoptotique Bad et la caspase-9 (Datta et al., 1997 ; Cardone et al., 1998). D'autres cibles de la PI 3-kinase, par exemple la kinase FRAP/mTOR, peuvent également médier la survie cellulaire (Hosoi et al., 1999). Cependant, la kinase FRAP/mTOR n'a pas été spécifiquement associée à la suppression de l'anoïkose jusqu'à présent. Le recrutement de Shc contribue également à la protection contre l'anoïkose (Pozzi et al.,

1998). Ainsi, les kinases MAP ERKs, qui se retrouvent en aval de Shc, seraient possiblement impliquées dans la promotion de la survie par les intégrines (Fig. 6). Cette hypothèse est plausible, puisque l'inhibition des kinases MAP ERKs est suffisante pour induire l'apoptose dans certains types cellulaires (Berra et al., 1998).

3.3.2 Signalisation et anoïkose

Les mécanismes responsables de l'induction de l'anoïkose demeurent largement incompris. Cependant, des études effectuées dans les cellules épithéliales nous apportent des brides de compréhension. Ces études nous apprennent que lors de l'anoïkose, la MEKK-1 (MAP kinase/ERK kinase kinase-1) est activée par épissage protéolytique (Cardone et al., 1997). Cet épissage protéolytique est effectué par une caspase effectrice (Cardone et al., 1997). L'inhibition de MEKK-1 inhibe partiellement l'anoïkose et l'activité des caspases effectrices. Ceci suggère donc une boucle d'amplification positive entre MEKK-1 et les caspases (Frisch et Ruoslahti, 1997). La surexpression de Bcl-2 inhibe l'anoïkose en empêchant l'activation des caspases et de MEKK-1 (Frisch et al., 1996). Donc, Bcl-2 pourrait agir en amont de la cascade en empêchant l'activation de la caspase initiateur (Frisch et Ruoslahti, 1997) (Fig. 7). Au cours de l'anoïkose, il y a également activation des kinases MAP de stress JNKs (Jun NH2-terminal kinases) qui peuvent se trouver en aval de la MEKK-1. Tel qu'observé dans le cas de MEKK-1, l'activation des JNKs au cours de l'anoïkose est dépendante des caspases (Frisch et al., 1996). Par contre, l'activité des

Figure 6. Intégrines et survie. Schéma représentant les voies de signalisation associées à la suppression de l'anoïkose. La liaison intégrine-matrice extracellulaire est capitale pour la survie cellulaire. Jusqu'à présent, il a été démontré que la promotion de la survie par les intégrines implique, dans certains cas, la tyrosine kinase FAK, la PI-3 kinase, la sérine/thréonine kinase Akt et les kinases MAP ERKs.



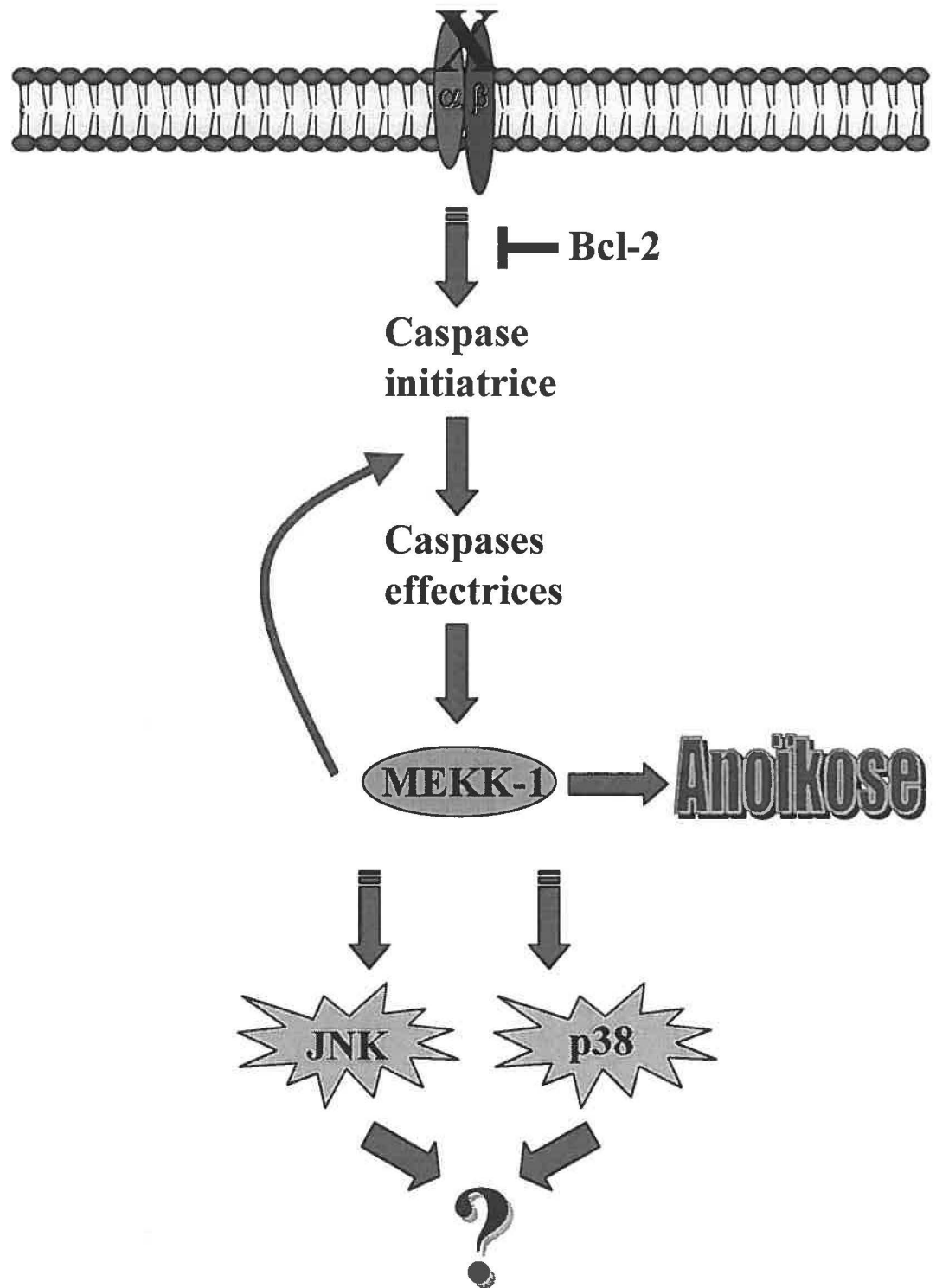
JNKs n'est pas essentielle à l'anoïkose (Khwaja et Downward, 1997 ; Krestow et al., 1999). La même observation a été rapportée dans le cas des kinases MAP p38, à savoir qu'elles sont activées au cours de l'anoïkose, mais leur inhibition n'empêche pas cette dernière (Khwaja et Downward, 1997) (Fig. 7).

3.3.2.1 Kinases MAP p38

La famille des «mitogen-activated protein» (MAP) kinases permet de transmettre une variété impressionnante de signaux extracellulaires. Les kinases MAP sont subdivisées en trois sous groupe : les kinases MAP ERKs, les JNKs (c-Jun NH2-terminal kinase) et les kinases MAP p38. Chaque kinase MAP est le point culminant d'un module de signalisation où l'information est transmise par une cascade de phosphorylation hiérarchique. Cette cascade de phosphorylation se termine généralement par la translocation au noyau des kinases MAP et la phosphorylation de certains facteurs de transcription.

Les JNKs et les kinases MAP p38 répondent principalement à divers stress cellulaires. Par exemple, les kinases MAP p38 sont activées en réponse à l'hyperosmolarité (Han et al., 1994), à certaines toxines (Han et al., 1994) et à l'irradiation ultra-violet (Hazzalin et al., 1996). Elles sont également activées par certaines cytokines inflammatoires telle le TNF- α (Winston et al., 1997). Chez les mammifères, quatre isoformes des kinases MAP p38 ont été identifiées, soit p38

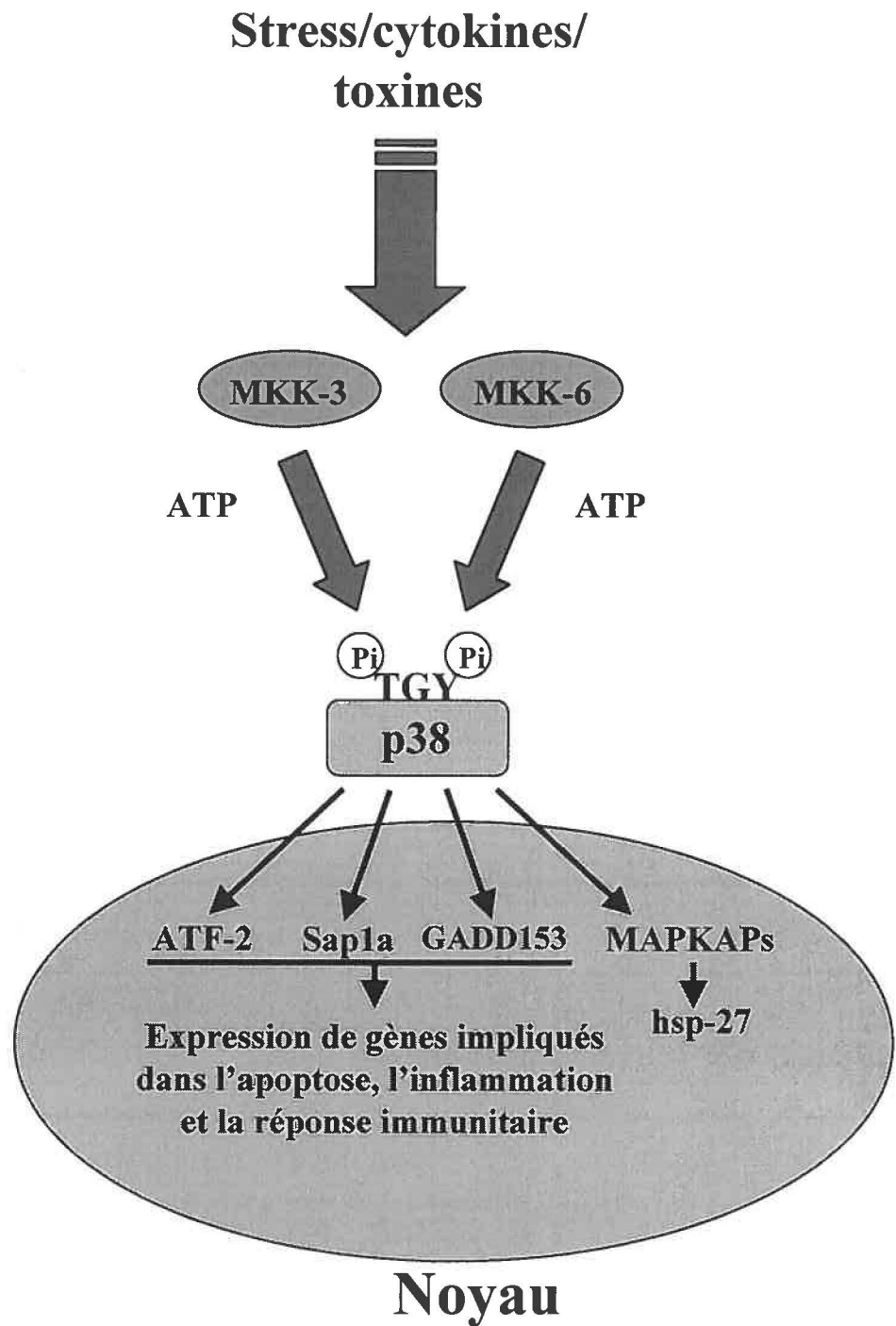
Figure 7. Voies de signalisation activées lors de l'anoïkose. La perte du lien cellule-matrice extracellulaire active une caspase initiateur et des caspases effectrices. Parmi les cibles des caspases effectrices, on retrouve la MEKK-1 qui se trouve alors activée par épissage protéolytique. Une boucle d'amplification positive entre MEKK-1 et les caspases se met alors en branle. Les MAP kinases JNKs et p38 sont également activées au cours de l'anoïkose. Par contre, leur activité n'est pas essentielle à l'anoïkose. Finalement, Bcl-2 peut court-circuiter l'anoïkose au niveau des étapes précoces.



α , β , γ et δ . Ces différentes isoformes exhibent une distribution tissulaire différentielle. Ainsi, les isoformes α et β sont exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme, l'isoforme δ est concentrée dans le tissu nerveux, alors que p38 γ est spécifique au tissu musculaire et n'apparaît qu'au cours de la différenciation myogénique. Les kinases MAP p38 phosphorylent entre autres les facteurs de transcription ATF-2 (Price et al., 1996), Sap-1a (Janknecht et Hunter, 1997) et GADD153 (CHOP) (Wang et Ron, 1996). Elles activent également certaines kinases comme les MAPKAPK-2, -3 et -5 (MAP kinase-activated protein kinase) (Clifton et al., 1996). Les MAPKAPKs peuvent phosphoryler et activer hsp 27. Cette dernière peut, entre autre, moduler les propriétés des microfilaments d'actine (Guay et al., 1997).

L'activité des kinases MAP p38 est dépendante d'une double phosphorylation sur le motif TGY (thréonine-glycine-tyrosine). Cette double phosphorylation est effectuée par des kinases à double spécificité qui se retrouvent en amont des kinases MAP p38 dans la cascade de phosphorylation. Plus spécifiquement, les kinases MKK-3 (Han et al., 1994) et MKK-6 (Stein et al., 1996) sont principalement responsables de l'activation des kinases MAP p38. Ces kinases à double spécificité sont elles-mêmes activées par phosphorylation. Cette fonction est en partie assurée par les sérine/thréonine kinases de la famille MLK (mixed lineage kinases). Par exemple, MLK-3 peut phosphoryler et activer MKK-3 et MKK-6 (Tibbles et al., 1996). MKK-6 peut également être phosphorylée et activée par ASK-1 (apoptosis-regulating kinase 1) (Ichijo et al., 1997). Les étapes en amont de l'activation de

Figure 8. Représentation schématique de la voie des kinases MAP p38. De façon générale, l'activation des kinases MAP p38 fait suite à différents stress cellulaires. L'activation des kinases MAP p38 se concrétise par la double phosphorylation du motif TGY (thréonine-glycine-tyrosine). En réponse à cette activation, les kinases MAP p38 transloquent au noyau et phosphorylent leurs substrats. En bout de ligne, l'activité des kinases p38 MAP peut influencer l'apoptose, la différenciation, l'inflammation et la réponse immunitaire. Abréviation : Pi = Phosphate.



MLK-3 et ASK-1 sont peu caractérisées. Toutefois, il semble que des petites protéines G de la famille Rho, telles Rac et Cdc42, soient impliquées (Coso et al., 1995) (Fig. 8).

Les fonctions des kinases MAP p38 font encore l'objet de nombreuses études. Toutefois, un certains nombres de fonctions leur ont été attribuées. Par exemple, les kinases MAP p38 sont impliquées dans la réponse immunitaire (Matsuda et al., 1998), l'inflammation (Crawley et al., 1997), la différenciation (Zester et al., 1999), la prolifération (Crawley et al., 1994) et l'apoptose (Xia et al., 1995). L'apoptose induite par une gamme étendue de stimuli semble impliquer les kinases MAP p38. Par exemple, les kinases MAP p38 sont nécessaires à l'apoptose des neurones privés de facteurs de croissance ou exposés à une trop forte concentration de neurotransmetteurs (Xia et al., 1995 ; Kawasaki et al., 1997). L'activation des kinases MAP p38 est également intimement reliée à l'apoptose induite par choc thermique (Gabai et al., 1997) ou irradiation UV (Franklin et al., 1998). Selon le type cellulaire étudié et le stimulus pro-apoptotique, les kinases MAP p38 peuvent agir en amont (Franklin et al., 1998) ou en aval des caspases (Ozaki et al., 1999). Donc, le rôle des kinases MAP p38 dans l'apoptose peut être à la fois au niveau des étapes précoces et des étapes tardives. L'activation des kinases MAP p38 observée au cours de l'apoptose n'est pas toujours nécessaire au déroulement de celle-ci tel que mentionné précédemment dans le cas particulier de l'anoïkose (Khwaja et al., 1997). De plus, l'activité des kinases MAP p38 peut également avoir un effet cytoprotecteur dans certains systèmes cellulaires (Roulston et al., 1998 ; Nemoto et al., 1998). Cette

versatilité des kinases MAP p38 face à l'apoptose serait due aux différentes isoformes. En effet, dans les lymphocytes T, p38 β protège contre l'apoptose alors que p38 α joue un rôle actif dans l'apoptose (Nemoto et al., 1998 ; Wang et al., 1998). De façon similaire, p38 α induit l'apoptose dans les myocytes cardiaques (proches parents des fibres musculaires squelettiques), alors que p38 β contribue à l'hypertrophie de ces cellules (Wang et al., 1998). Donc, l'implication des kinases MAP p38 dans l'apoptose dépend du type cellulaire concerné, du stimulus pro-apoptotique et de l'isoforme spécifiquement activée.

4. Dystrophies musculaires congénitales à déficience en mérosine

Les dystrophies musculaires constituent un groupe hétérogène de physiopathologies d'origine génétique résultant en une faiblesse croissante et une dégénération progressive des fibres musculaires. L'hypotonie musculaire qui en résulte affecte les fonctions du muscle squelettique. Ceci se traduit par des troubles de locomotion et de posture ainsi que par des contractions et des déformations articulaires.

La majorité des altérations génétiques en cause dans les dystrophies musculaires affectent des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion des fibres musculaires (Campbell, 1995). Par exemple, une mutation dans le gène de la dystrophine est à la base des dystrophies musculaires de Duchenne-Becker.

Ensuite, des altérations génétiques primaires au niveau des sarcoglycans mènent à la perte d'expression du DAG, causant ainsi les sarcoglycanopathies. Finalement, l'altération des fonctions ou des niveaux d'expression de la mérosine conduit à la dystrophie musculaire congénitale à déficience en mérosine (Tsao et Mendell, 1999). L'acronyme MCMD («merosin-deficient congenital muscular dystrophy») est utilisé pour désigner ce type de dystrophie musculaire. Chez l'humain, la MCMD est une maladie autosomique récessive causée par une mutation dans le gène LAMA2 codant pour la sous unité $\alpha 2$ de la mérosine (Helbling-Leclerc et al., 1995 ; Tomé et al., 1994). Les différentes mutations résultent en la synthèse d'une protéine tronquée ou en l'absence totale de mérosine dans la lame basale des fibres musculaires. Des souris mutantes naturelles pour le gène *lama2* ont servi de modèle d'étude et sont à la base de plusieurs découvertes importantes concernant la MCMD. Ainsi, la souris homozygote *dy/dy* exprime des niveaux de mérosine quasi indétectable, tandis que la souris *dy^{2J}/dy^{2J}* exprime une sous-unité $\alpha 2$ tronquée (Sunada et al., 1994 ; Xu et al., 1994a, 1994b). En majeure partie, les caractéristiques moléculaires et physiopathologiques des souris *dy/dy* et *dy^{2J}/dy^{2J}* ont leur pendants chez les patients atteints de la MCMD. Donc, la souris constitue un bon modèle d'étude pour la MCMD.

4.1 Effets de l'absence de mérosine sur l'intégrité des fibres musculaires squelettiques

Dans le but de mieux comprendre la MCMD, les effets de l'absence de mérosine sur l'intégrité des fibres musculaires ont été étudiés. Dans un premier temps, des études en microscopie électronique à transmission effectuées chez les souris *dy* et *dy^{2J}* ont démontré des altérations morphologiques sévères de la lame basale des fibres musculaires en absence de mérosine. En effet, la lame basale des fibres musculaires est mince et discontinue chez ces souris (Xu et al., 1994a). D'autres études effectuées chez des lignées cellulaires myogéniques n'exprimant pas la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine ont permis de mieux comprendre les rôles joués par la mérosine dans le tissu musculaire (Vachon et al., 1996,1997). Ces études ont tout d'abord démontré que la mérosine, tout comme la laminine-1, joue un rôle important au niveau de la fusion des myoblastes (Vachon et al., 1996) (Fig. 9). De ce fait, il est possible que la régénération soit affectée dans la MCMD, accentuant ainsi la dégénération musculaire. Cette hypothèse est supportée par une étude qui démontre que la régénération musculaire est inefficace chez des souris «knock out» pour la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine (Kuang et al., 1999). D'autre part, il a été observé que les myotubes qui n'expriment pas la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine sont instables et dégénèrent (Vachon et al., 1996). Lorsque ces mêmes myotubes sont cultivés en présence de mérosine purifiée ou transfectés avec la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine, ceux-ci se trouvent stabilisés (Vachon et al., 1996). Cependant, la laminine-1 ne partage pas cette fonction de la mérosine (Vachon et al., 1996). Il a été également

rapporté que les myotubes déficients en mérosine entrent spontanément en anoïkose, ce qui explique la dégénération observée dans la MCMD (Vachon et al., 1996 ; Kuang et al., 1998). Il est important de noter que la survie des myoblastes non-fusionnés n'est pas affectée par l'absence de mérosine (Vachon et al., 1996). L'anoïkose des myotubes est spécifiquement due à l'absence de mérosine, puisque la restauration de son expression par transfection corrige l'instabilité des myotubes et inhibe l'anoïkose musculaire (Vachon et al., 1996). La mérosine joue donc un rôle critique et spécifique au niveau de la survie des myotubes. Ceci implique que l'anoïkose pourrait jouer un rôle majeure dans la progression physiopathologique de la MCMD (Fig. 9).

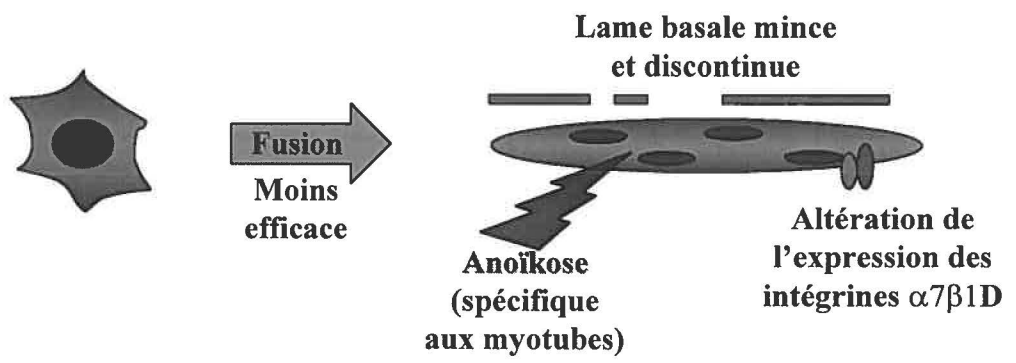
Chez les souris *dy* et *dy^{2J}*, l'absence de mérosine cause une diminution d'expression et une altération de la distribution membranaire des intégrines $\alpha7(A,B)\beta1D$ (Vachon et al., 1997). Toutefois, l'absence de mérosine n'altère pas l'expression du DAG (Vachon et al., 1997). Cette diminution d'expression des intégrines $\alpha7(A,B)\beta1D$ est également observée *in vitro* chez des myotubes déficients en mérosine. Cette perte d'expression n'est pas une conséquence de l'anoïkose, puisque la surexpression de Bcl-2 court-circuite l'anoïkose de ces myotubes sans toutefois restaurer l'expression des intégrines $\alpha7(A,B)\beta1D$ (Vachon et al., 1997). L'altération d'expression des intégrines $\alpha7(A,B)\beta1D$ n'est cependant pas observée au niveau de l'ARMm (Vachon et al., 1997). Ainsi, il a été supposé que les intégrines $\alpha7(A,B)\beta1D$ sont dégradées en absence de leur ligand. Finalement, l'utilisation d'anticorps bloquant le domaine extracellulaire de la sous-unité $\beta1$ a permis de

démontrer que la promotion de la survie par la mérosine s'effectue via l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ (Vachon et al., 1997). Par conséquent, l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ est essentielle à la survie des myotubes. D'ailleurs, des mutations dans le gène codant pour la sous-unité $\alpha 7$ cause une dystrophie musculaire (Mayer et al., 1997 ; Hayashi et al., 1998). Ainsi, les fonctions de promotion de la survie des fibres musculaires de la mérosine seraient médiées par les intégrines $\alpha 7(A,B)\beta 1D$ (Fig. 9).

5. Modèles cellulaires utilisés

L'étude des caractéristiques et des fonctions du muscle squelettique a été facilitée par l'établissement de lignées cellulaires capables de différenciation myogénique. Parmi celles-ci, la lignée cellulaire C2 a été établie à partir du tissu musculaire prélevé chez les souris C3H (Yaffe et Saxel, 1977). Ces souris ne présentent aucune anomalie musculaire. Le sous-clone C2C12 (Blau et al., 1985) est le plus utilisé de tous les sous-clones issus de la lignée parentale C2. Les myoblastes de la lignée C2C12 prolifèrent et demeurent indifférenciés aussi longtemps qu'ils sont maintenus à sous confluence par passages successifs. À l'atteinte de la confluence, les myoblastes cultivés dans un milieu à faible teneur en sérum entament un processus de différenciation myogénique résultant en la formation de myotubes polynucléés. Ces derniers expriment différents marqueurs de différenciation des fibres musculaires matures tels la myogénine, l' α -actinine sarcomérique, la myosine musculaire, la créatine kinase et le récepteur de l'acétylcholine (Blau et al., 1985). Cependant, les

Figure 9. Représentation schématique de l'effets de l'absence de mérosine sur l'intégrité des fibres musculaires squelettiques. Une mutation dans le gène de la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine est à la base de la dystrophie musculaire congénitale à déficience en mérosine. L'absence de mérosine se traduit par une fusion moins efficace des myoblastes, une altération de la structure de la lame basale, une baisse d'expression et une distribution irrégulière des intégrines $\alpha 7\beta 1$ et par l'anoïkose des myotubes.



cultures de cellules C2C12 différenciées sont hétérogènes puisqu'elles contiennent des myotubes polynucléés ainsi que des myoblastes non-fusionnés (Fig. 10A).

Les cellules de la lignée C2C12.B4, sous-clone de la lignée C2C12, n'expriment ni la sous-unité $\alpha 1$ ni la sous unité $\alpha 2$ des laminines. Par le fait même, elles sont incapables de produire les laminine-1, -2, -4 et de fusionner (Vachon et al., 1996) (Fig. 10B). La fusion des C2C12.B4 est partiellement rétablie suite à la transfection du gène codant pour la sous-unité $\alpha 1$ de la laminine-1 humaine (C2C12.B4/plam) (Vachon et al., 1996). Cependant, la fusion de ces cellules génère des myotubes instables qui entre spontanément en anoïkose due à l'absence de mérosine. Cette anoïkose n'affecte pas les myoblastes, elle est donc spécifique aux myotubes (Vachon et al., 1996). De plus, l'expression des intégrines $\alpha 7(A,B)\beta 1D$ est altérée dans les C2C12.B4/plam. Tel que mentionné précédemment, cette altération d'expression $\alpha 7(A,B)\beta 1D$ prévaut également *in vivo* chez les souris dystrophiques *dy* et *dy*^{2J} (Vachon et al., 1997). Donc, les C2C12.B4/plam constitue un modèle *in vitro* de choix pour l'étude de la MCMD. Les C2C12.B4 ont également été transfectées de façon stable avec la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine, générant ainsi une autre lignée cellulaire nommée C2C12.B4/pmer (Vachon et al., 1996 ; cette étude). Comme dans le cas de la sous-unité $\alpha 1$, l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ rétablit partiellement la fusion. De plus, les myotubes issus de la fusion des myoblastes C2C12.B4/pmer sont stables et n'entrent pas en anoïkose (Fig. 10B). L'utilisation des C2C12.B4/pmer permet de confirmer que les observations effectuées chez les C2C12.B4/plam sont

réellement dues à l'absence de mérosine et représentent un modèle *in vitro* de MCMD corrigée (Vachon et al., 1996, 1997).

6. Hypothèse et Objectifs

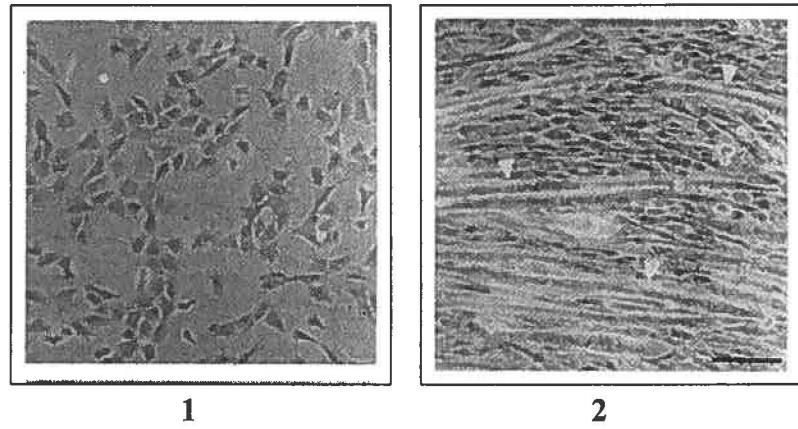
Étant donné que : 1) l'adhésion cellulaire constitue un facteur déterminant pour la survie cellulaire et que les intégrines jouent un rôle majeur dans ce processus en initiant diverses voies de signalisation intracellulaires ; 2) la perte d'adhésion cellulaire active certaines voies de signalisation intracellulaires qui mènent à l'induction de l'anoïkose ; 3) le système d'adhésion cellulaire $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine joue un rôle critique et spécifique dans la survie des fibres musculaires *in vivo* et *in vitro* ; notre hypothèse de travail est que le système d'adhésion cellulaire $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine génère une signalisation spécifiquement impliquée dans la survie des myotubes. À l'inverse, l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine engendre des voies de signalisation responsables de l'induction de l'anoïkose des myotubes, mais non pas des myoblastes indifférenciés.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'objectif général de la présente étude consistait à élucider les mécanismes moléculaires de l'anoïkose des fibres musculaires impliqués dans la MCMD. Nos objectifs spécifiques étaient les suivants :

- 1) Identifier les voies de signalisation, activées par le système d'adhésion cellulaire $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, responsables de la survie des fibres musculaires.
- 2) Identifier les voies de signalisation, activées lors de l'altération du système d'adhésion cellulaire $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, responsables de l'anoïkose des fibres musculaires.
- 3) Caractériser les mécanismes moléculaires de régulation de l'anoïkose des fibres musculaires par l'étude des niveaux d'expression relatifs de certains homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques.

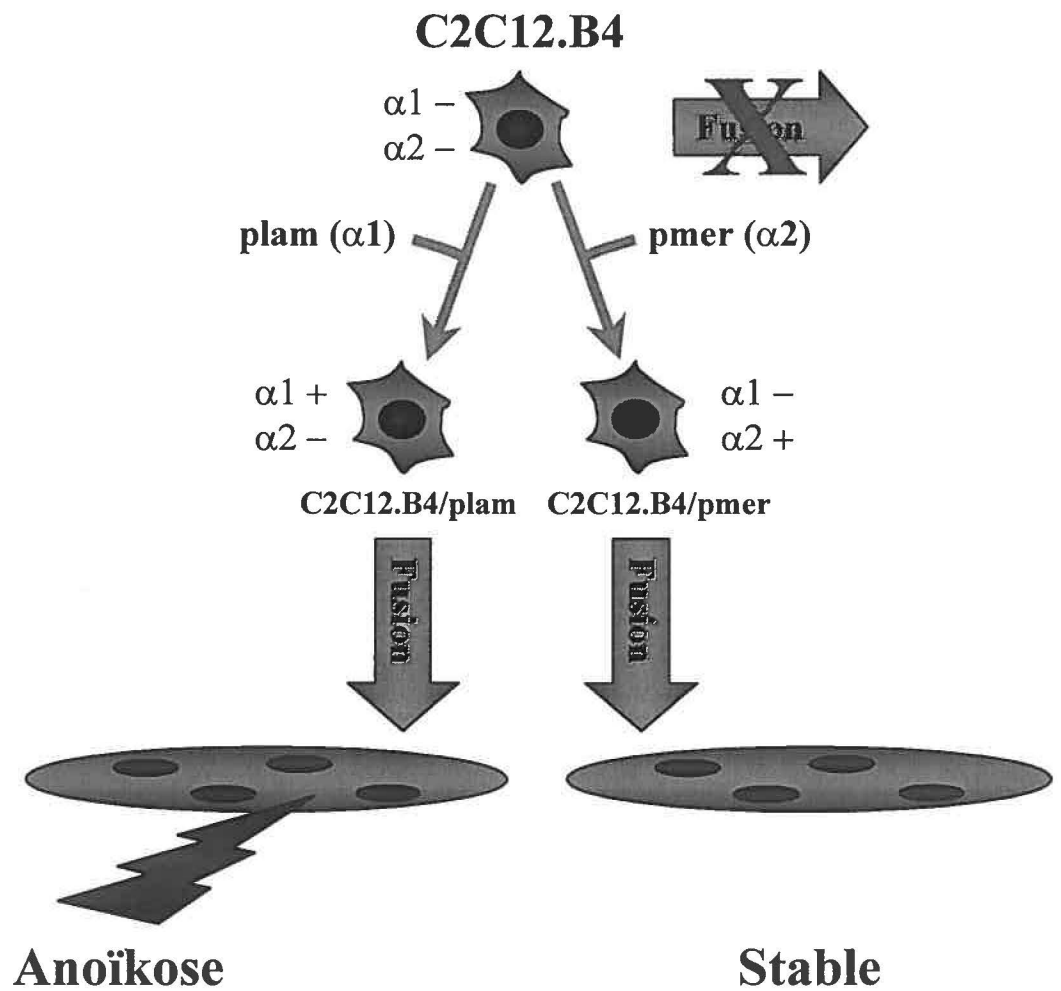
Figure 10. Modèles cellulaires. Les cellules de la lignée C2C12, originant du muscle squelettique de souris, ont la capacité d'entamer un programme de différenciation myogénique. Ce dernier résulte en la formation de myotubes polynucléés exprimant différents marqueurs de différenciation des fibres musculaires matures. (A) Photomicrographie de cultures de cellules C2C12 indifférenciées (1) et différenciées (2). Les têtes de flèches pointent des myotubes polynucléés qui se trouvent parmi un nombre important de myoblastes non-fusionnés. (B) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour obtenir les C2C12.B4/plam et les C2C12.B4/pmer. Les cellules C2C12.B4/plam, n'exprimant pas la mérosine, constituent un excellent modèle d'étude de la MCMD. Pour leur part, les C2C12.B4/pmer permettent de confirmer que les observations faites chez les C2C12.B4/plam sont bel et bien dues à l'absence de mérosine et représentent un modèle de MCMD corrigée.

A



Vachon et al., 1996

B



II – MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires C2C12 (provenant originalement de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD)), C2C12.B4 et C2C12.B4/plam (Vachon et al., 1996) nous ont été gracieusement données par la Dre E. Engvall (The Burnham Institute, La Jolla, CA). Les cellules C2C12 (Blau et al., 1985), issues du muscle squelettique de souris, sont capables de différenciation myogénique. La lignée C2C12.B4 est un sous-clone de la lignée C2C12 obtenu par dilution limite (Vachon et al., 1996). Les cellules C2C12.B4/plam ont été obtenues par transfection stable de la sous-unité $\alpha 1$ de la laminine-1 humaine dans les C2C12.B4 (Vachon et al., 1996) (pour une description plus détaillée de ces types cellulaires voir la section 5 de l'introduction). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ont.) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (ICN biomedical, Aurora, OH), de 10 mM Hepes, d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine) et de 0,1 mM d'acides aminés non-essentiels (tous trois provenant de Gibco BRL). Les cellules ont été incubées à 37°C sous une atmosphère humide composée de 95 % d'air et de 5 % CO₂ jusqu'à confluence (48 hrs). Le milieu culture était alors remplacé par un milieu de différenciation de même composition que le milieu de culture, excepté qu'il contenait seulement 1 % de sérum. Suite à ce changement de milieu, les cellules étaient incubées pendant cinq jours

(milieu renouvelé aux 48 heures), dans les conditions décrites ci-haut, permettant ainsi leur différenciation myogénique (Vachon et al., 1996 ; Schuler et Sorokin, 1995).

2. Transfection des C2C12.B4 avec la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine (vecteur P941)

L'expression de la mérosine a été restaurée dans les C2C12.B4 par transfection de la sous-unité $\alpha 2$ de la mérosine humaine. Cette dernière était sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus dans le vecteur d'expression pcDNA3 qui contenait un gène de résistance à la néomycine (G418). Ce vecteur d'expression, nommé P941 (fournit par le Dr E. Engvall), a été transfecté dans les cellules C2C12.B4 par lipofection (Vachon et al., 1996). La technique a été mise au point pour la transfection d'une culture cellulaire contenue dans un pétri de 100 mm (Becton-Dickenson Labware, Franklin Lake, NJ) à 50-60 % de confluence (Vachon et al. 1996).

Dans un tube de 12 ml (Sarstedt, St-Léonard, Qc), 10 μ g du vecteur ont été ajoutés à 800 μ l de milieu ne contenant ni sérum ni antibiotique (milieu de transfection). De façon concomitante, 200 μ g de lipofectamine (Gibco BRL) ont été ajoutés à 800 μ l de milieu de transfection dans un autre tube de 12 ml. Le contenu des deux tubes a alors été mélangé puis incubé pendant 45 minutes à température de la pièce avec agitations occasionnelles. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées à deux reprises avec du milieu de transfection et 6,4 ml de ce milieu ont été

ajoutés au tube contenant le mélange composé du vecteur d'expression et de la lipofectamine. La solution résultante (volume final de 8 ml) a été ajoutée à la culture cellulaire. Suite à une incubation de 5 heures à 37°C (conditions usuelles), 8 ml de milieu de transfection supplémenté de 20 % de sérum ont été ajoutés au pètri puis l'incubation s'est poursuivie pour une période de 24 heures. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu de culture frais jusqu'à ce que la culture cellulaire atteigne 90-95 % de confluence. À ce moment, un passage des cellules (1:5) a été effectué et la sélection a été amorcée grâce à un milieu de culture supplémenté de 400 µg/ml de G418 (Gibco BRL). Les colonies ont finalement été récupérées grâce à la technique du cylindre (Corning, Acton, MA) et soumises à une expansion clonale. Par la suite, les clones stables (C2C12.B4/pmer) ont été cultivés de façon identique aux cellules non-transfectées excepté que l'agent de sélection était toujours présent dans le milieu de culture.

3. Incubation avec les différents inhibiteurs

Dans le but d'identifier des voies de signalisation impliquées dans la survie des fibres musculaires, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques inhibant des voies de signalisation connues pour promouvoir la survie dans plusieurs types cellulaires. Les différents inhibiteurs utilisés ont été ajoutés à du milieu de différenciation pré-chauffé à 37°C. La solution résultante a été vortexée avant d'être utilisée pour remplacer le milieu de différenciation. La même procédure a été utilisée

pour l'anticorps P4C10 (100 µg/ml) qui est utilisé pour bloquer le domaine extracellulaire de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines (Carter et al., 1990 ; Mould et al., 1997 ; Vachon et al., 1997).

3.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Herbimycine A (Sigma, Oakville, Ont.). Inhibiteur des tyrosines kinases. L'herbimycine A est reconnue pour inhiber efficacement les tyrosines kinases de la famille Src à une concentration de 1 µM (Park et al., 1991).

PP2 (Calbiochem, San diego, CA). Inhibiteur sélectif des tyrosines kinases de la famille Src (Keely et Parise, 1996). Nous avons utilisé le PP2 à une concentration de 5-20 µM (Keely et Parise, 1996).

SB 202190 (Calbiochem). Inhibiteur des kinases MAP p38 (Young et al., 1997). Nous avons utilisé le SB 202190 à une concentration de 20 µM, une concentration fréquemment utilisée (Wang et al., 1998).

PD 98059 (Calbiochem). Inhibiteur sélectif des MAP kinases kinases MEK-1 et -2. Donc, le PD 98059 permet d'inhiber indirectement les kinases MAP p42/p44 qui se trouvent en aval des MEKs. Tout comme le suggère la littérature, nous avons employé le PD 98059 à une concentration de 20 µM (Dudley et al.,1995).

Ly 294002 (Calbiochem). Inhibiteur efficace et spécifique de la PI 3-kinase (Vlahos et al., 1994). Nous avons utilisé le Ly 294002 à une concentration de 5 μ M (Vlahos et al., 1995).

Rapamycine (Sigma). Inhibiteur de la kinase FRAP/mTOR. Nous avons utilisé la rapamycine à une concentration de 20 ng/ml, une concentration couramment utilisée (Aagaard-Tillery et al., 1994).

GF109203X (Calbiochem). Inhibiteur à large spectre des PKCs. Le GF109203X est normalement utilisé à une concentration de 2 μ M (Heikkilä et al., 1993). Nous l'avons utilisé à des concentrations variant de 1 à 4 μ M.

Go6983 (Calbiochem). Inhibiteur à large spectre des PKCs. Le Go6983 est normalement utilisé à une concentration de 5 μ M (Stempka et al., 1997). Nous l'avons utilisé à des concentrations variant de 2,5 à 10 μ M.

Cytochalasine D (Sigma). Interfère avec la polymérisation de l'actine et empêche l'activation de la tyrosine kinase FAK (Lipfert et al., 1992). Nous avons utilisé la cytochalasine D à une concentration de 1 μ M.

Indométacine (calbiochem). Inhibiteur des cyclooxygénase-1 et -2. Nous avons utilisé l'indométacine à une concentration de 1 μ M (Futaki et al., 1994).□

NS398 (Calbiochem). Inhibiteur sélectif de la cyclooxygénase-2. Nous avons utilisé le NS398 à une concentration de 10 μ M (Futaki et al., 1994).

Tableau 1. Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Inhibiteurs	Enzyme inhibée	Concentration utilisée	Source
Herbimycine A	TKs Src	1 μ M	Sigma
PP2	TKs Src	5 μ M	Calbiochem
SB 202 190	MAPK p38	20 μ M	Calbiochem
PD 98059	MEK 1-2	20 μ M	Calbiochem
Ly 294002	PI-3 kinase	5 μ M	Calbiochem
Rapamycine	mTOR	20 ng/ml	Sigma
GF 109203X	PKC	1-4 μ M	Calbiochem
Go 6983	PKC	2,5-10 μ M	Calbiochem
Cytochalasine D	FAK	1 μ M	Sigma
Indométacine	Cyclooxygénase-1,2	1 μ M	Calbiochem
NS398	Cyclooxygénase-2	10 μ M	Calbiochem

4. Mise en évidence de l'apoptose

4.1 Détection de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose

L'impact des différents inhibiteurs sur la survie cellulaire a été évalué par détection de la dégradation internucléosomique de l'ADN (une caractéristique de l'apoptose) sur gel d'agarose. Le protocole utilisé était une version légèrement modifiée de la technique décrite par Bissonette et al. en 1998. Dans la première étape de ce protocole, le milieu de culture a été récupéré dans un tube de 12 ml et centrifugé à 1500 rpm dans une centrifugeuse Centra CL3R (International Equipment Company (IEC), Needham Height, MA) pendant 5 minutes. Pendant ce temps, 700 µl de tampon de lyse (0,6 % SDS, 10 mM EDTA) ont été ajoutés aux cellules toujours adhérentes dans le pétri (100 mm). Le culot, issu de la centrifugation, a été récupéré avec 50 µl de tampon de lyse et ajouté au pétri pour une incubation de 20 minutes à température de la pièce. Les cellules ont été ensuite récupérées dans un microtube (Sarstedt) et une solution de NaCl 5 M a été ajoutée pour obtenir une concentration finale de 1 M. Après une incubation de 16 hrs à 4 °C, les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 30 minutes toujours à 4 °C (microfugeuse Micro 12 ; Fischer Scientific, Nepean, Ont.). Par la suite, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux microtubes, une extraction phénol(25)/chloroforme(24)/isoamyl⁽¹⁾ (Fischer Scientific) a été effectuée et la concentration de NaCl a été amené à 1,3 M avant la précipitation avec 1 volume d'isopropanol à - 20 °C. Suite à une centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 minutes (4 °C), les culots obtenus ont été

lavés avec 500 µl d'éthanol 100 % (-20 °C) puis séchés. Ils ont ensuite été resuspendus dans 30 µl de TE (Tris 10 mM pH 8, 1 mM EDTA) et incubés en présence de 80 µg/ml d'ARNase A (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc) pendant 1 heure à 37°C. Les contenus en ADN des échantillons ont été mesurés au spectrophotomètre (Genesis 5 ; Milton Roy, Rochester, NY) à 260 nm et 20 µg de chaque échantillon ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (BIO-RAD, Hercules, CA) 1,5 % contenant 0,0001% de bromure d'éthidium (Fischer Scientific). L'électrophorèse s'est déroulée à 100 V dans un tampon TAE (40 mM Tris, 0,2 % acide acétique glaciale et 1mM EDTA) qui servait également à dissoudre l'agarose. Finalement, le gel a été photographié sous UV grâce à un trans-illuminateur et à une caméra digitale (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

4.2 TUNEL *in situ*

Le TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP mediated nick end labelling) *in situ* est une autre technique permettant la détection de la dégradation de l'ADN. Cependant, cette technique possède la particularité de permettre la détection de la dégradation de l'ADN au sein de cellules individuelles. La technique consiste à marquer l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN avec un nucléotide couplé à un épitope telle la dioxygénine. Le nucléotide est ajouté par réaction enzymatique catalysée par la «terminal deoxynucleotidyl transferase» (TdT). Le marquage des fragments d'ADN peut finalement être visualisé au microscope à fluorescence par

l'utilisation d'un anticorps anti-dioxigénine couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Le TUNEL *in situ* a été effectué selon une version modifiée du protocole fourni avec le «Apoptag fluorescein *in situ* detection kit » (Intergen, Purchase, NY). Premièrement, les cellules, cultivées sur lamelles de verre 12 mm (Fischer Scientific), ont été fixées dans une solution de PBS/formaldéhyde (Sigma) 2 % pendant 45 minutes à 4 °C. La fixation se déroulait directement dans le puit de la plaque 24 puits (corning) dans laquelle les cellules ont été cultivées. Les lamelles ont ensuite été lavées sous agitation à trois reprises pendant 5 minutes dans du PBS contenant 0,1 % triton-X-100 (Boeringer Mannheim, Laval, Qc) pour perméabiliser les cellules et à une reprise dans du PBS. Les lamelles étaient alors transférées sur une lame de verre (Fischer Scientific) puis incubées 2 minutes avec le tampon d'équilibration. La réaction a été ensuite amorcée par l'ajout de la solution enzymatique (TdT diluée 3,33 fois dans le tampon de réaction) à 37 °C pour 1 heure. La réaction se terminait par l'incubation des lamelles dans le tampon d'arrêt pendant 10 minutes à température de la pièce. Suite à trois lavages de 5 minutes dans du PBS, les lamelles ont été incubées avec l'anticorps anti-dioxigénine couplé à la fluorescéine (dilué 2,15 fois dans la solution de blocage) pour une période de 30 minutes à température de la pièce. Les lamelles étaient alors lavées à trois reprises durant 5 minutes dans du PBS, colorées dans une solution de 0.01 % de bleu d'Evans (Sigma) puis soumises à nouveau à trois lavages de 5 minutes toujours dans du PBS. Finalement, les lamelles ont été montées dans une solution de glycérol-PBS 9 : 1 contenant 0,1 % de paraphénylène diamine (Sigma) puis observées à l'aide d'un microscope Reichert Polyvar 2 (Leica, St-Laurent, Qc).

5. Isolement des myotubes (*Version modifiée de Belkin et al., 1996*)

Comme mentionné à la section 5 de l'introduction, la différenciation *in vitro* des C2C12 n'est pas totalement efficace. L'étude des propriétés spécifiques aux myotubes demande donc leur isolation de la population totale qui contient également des myoblastes non-fusionnés. La technique utilisée à cette fin consistait à aspirer le milieu de culture d'un pétri de 100 mm puis à rincer deux fois avec du PBS. Par la suite, les cellules ont été incubées dans 1 ml d'une solution composée de 0,05 % trypsine et de 0,53 mM EDTA (Gibco BRL) diluée 1/5 dans du milieu DMEM pendant 10 minutes à 37°C. Les myotubes étaient alors récupérés avec 4 ml de PBS à 4 °C. Lorsque les myotubes étaient isolés dans le but d'observer l'activation des kinases MAP p38, 100 µM d'orthovanadate de sodium (inhibiteur des tyrosines phosphatases) étaient ajoutés. La solution de récupération était ensuite recueillie dans un tube de 12 ml et centrifugée à 1500 rpm pendant 3 minutes. Les myotubes (culot) ont été ensuite solubilisés dans 200 µl de tampon de solubilisation Laemmli (se référer à la section 6).

6 *Western Blot*

6.1 Solubilisation des protéines

Une fois le milieu de culture aspiré, les cellules (pétri de 100 mm) ont été lavées à deux reprises avec du PBS. Par la suite, 700 µl de tampon de solubilisation Laemmli (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 0,23 % de SDS, 10 % de glycérol, 0,005 % de bleu de bromophénol (Sigma) et 5 % de β-mercatoéthanol (BIO-RAD)) ont été ajoutés par pétri de 100 mm (200 µl dans le cas des myotubes isolés). Après 10 minutes, les échantillons ont été récupérés dans un microtube, soniqués (Ultrasonic processor ; Mandel Scientific, St-Laurent, Qc) 4 fois pendant 5 secondes puis chauffés à 100 °C (Standard Heatblock, ; VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Qc) pour une période de 5 minutes. Finalement, les débris cellulaires restants ont été éliminés suite à une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm (microfugeuse Micromax ; IEC) et les surnageants ont été conservés à -20 °C.

6.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Suite au dosage selon la méthode modifiée de Lowry (Peterson G.L., 1977), cinquante microgrammes de protéines ont été prélevés de chaque échantillon puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes avant d'être séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant 10 % ou 15 % (Ready gel Tris 15 % ; BIO-RAD). Un marqueur de poids

moléculaire coloré a aussi été déposé sur le gel (7,2-212 kD Broad Range ; BIO-RAD). L'électrophorèse se déroulait à 100 volts dans un tampon composé de 25 mM Tris, 0,1 % SDS et 192 mM glycine. Une fois la migration complétée, les protéines ont été soumises à un électrotransfert liquide (100 V, 1 heure) sur une membrane de nitrocellulose (Gibco BRL) pré-incubée 10 minutes dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine et 20 % méthanol). L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration de la membrane au rouge ponceau (Sigma) 0,2 %. Les membranes ont été décolorées dans du PBS contenant 0,05 % de tween-20 (BIO-RAD).

6.3 Immunodétection des protéines (Western Blot)

Les membranes ont d'abord été saturées en protéines (blocage) par une incubation minimale d'une heure dans une solution de lait écrémé en poudre 10 % dissout dans le PBS/tween-20 0,05 % (blotto). Les membranes ont ensuite été incubées dans la solution d'anticorps primaire (dilué dans le blotto) pour une période de 16 heures à 4 °C. Par la suite, les membranes ont été soumises à quatre lavages de 5 minutes sous agitation dans la solution de PBS/tween-20 0,05 %. Cette étape a été suivie de l'incubation avec la solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, aussi dilué dans le blotto, pendant une heure à température de la pièce. Les membranes ont alors été lavées 2 fois avec la solution PBS/tween-20 0,05 % et 2 fois avec du PBS pour une période de 5 minutes à chaque fois. Les bandes immunoréactives ont finalement été révélées par ajout de la solution ECL (Amersham Life Science,

Piscataway, NJ) et exposition sur des films Hyper film ECL (Amersham Life Science).

6.3.1 Anticorps primaires utilisés

A) Anticorps polyclonaux produits chez le lapin.

Les anticorps polyclonaux dirigés contre Bcl-2 (1632/34-19) (Krajewski et al., 1994a), Bax (1696-4) (Krajewski et al., 1994b), Bcl-X_L (1695-5) et Bag-1 (1735) (Takayama et al., 1995 ; Wang et al., 1996) nous ont été gracieusement fournis par le Dr J.C. Reed (La Jolla Cancer Research Foundation, CA). Nous avons également utilisé les anticorps polyclonaux dirigés contre BAK (G-23-G) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), Fyn (FYN3) (Santa Cruz), Yes (c-Yes(3)) (Santa Cruz), p38 active (p38 MAPK (thr 180/tyr 182)) (New England Biolabs, Mississauga, Ont.) et p38 totale (p38MAPK Ab) (New England Biolabs).

B) Anticorps monoclonaux originant de la souris

Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre Bad (B36 420 clone 48) (Transduction Laboratories, Mississauga, Ont.), l'actine (Anti-actine clone 4) (Roche Diagnostics, Laval, Qc) et l' α -actinine sarcomérique (EA-53) (Sigma).

6.3.2 Anticorps secondaires

Nous avons utilisé les anticorps secondaires couplés à la peroxydase NA 9340 (Amersham) dirigés contre des IgG de lapin et NA 931 (Amersham) dirigé contre des IgG de souris.

Tableau 2. Anticorps utilisés pour les analyses en western blot

Anticorps primaires				
Anticorps	Type/espèce	Protéine reconnue	Dilution	Source
1632/34-19	Polyclonal/lapin	Bcl-2	1/1000	J.C. Reed
1696-4	Polyclonal/lapin	Bax	1/1000	J.C. Reed
1695-5	Polyclonal/lapin	Bcl-X _L	1/1000	J.C. Reed
1735	Polyclonal/lapin	Bag-1	1/2000	J.C. Reed
G-23-G	Polyclonal/lapin	Bak	1/500	Santa Cruz
B36 420 (clone 48)	Monoclonal/souris	Bad	1/500	Transduction Laboratories
FYN 3	Polyclonal/lapin	Fyn	1/1000	Santa cruz
c-Yes (3)	Polyclonal/lapin	Yes	1/500	Santa Cruz
p38 MAPK (thr 180/tyr 182)	Polyclonal/lapin	^{pp} p38	1/500	New England Biolabs
p38 MAPK Ab	Polyclonal/lapin	p38	1/1000	New England Biolabs
Anti-actine clone 4	Monoclonal/souris	Actine	1/5000	Roche diagnostics
EA-53	Monoclonal/souris	α -actinine sarcomérique	1/5000	Sigma

6.4 Déshybridation des membranes

Pour certaines expériences d'analyse en western Blot, les membranes ont été déshybridées suite à une première utilisation par une incubation de 20 minutes à température de la pièce dans une solution de 100 mM glycine à pH 2,9. Les membranes ont ensuite été lavées à trois reprises pendant 5 minutes avec du PBS. Le Western Blot subséquent était amorcé à l'étape du blocage avant l'incubation avec l'anticorps primaire.

6.5 Test statistique

Suite à l'analyse densitométrique, le test statistique de Student a été utilisé pour déterminer si les valeurs étaient significativement différentes du contrôle dans un intervalle de confiance $0,001 \leq p \leq 0,05$.

7 Dosage de l'activité de la tyrosine kinase Fyn

Le dosage de l'activité des kinases Fyn et Yes a été réalisé selon le protocole de Chen et al. en 1994.

A) Lyse cellulaire. Les cellules (pétri 100 mm) ont d'abord été lavées à deux reprises avec le tampon de lavage refroidi à 4 °C (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl et 100 µM d'orthovanadate de sodium). Ensuite, les cellules ont été solubilisées dans 700 µl de tampon de lyse (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 100 µM d'orthovanadate de sodium, 10 mM NaF, 1 % aprotinine, 1 µg/ml leupeptine et 1mM de fluorure de phénylmethylsulfonyl) pendant 10 minutes à 4 °C, récupérées dans un microtube puis centrifugées à 4 °C pendant 10 minutes à 10000 rpm. Finalement, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux microtubes et soumis à l'immunoprécipitation.

B) Immunoprécipitation des tyrosines kinases Fyn et Yes. À 800 µg de protéine, 2 µg d'anti-Fyn ou d'anti-Yes (Santa Cruz) ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 800 µl avec le tampon de lyse. Suite à une incubation de 2 heures à 4 °C avec agitation, 4 µg de billes de sépharose conjuguées à la protéine A (Sigma) ont été ajoutés puis l'incubation s'est poursuivie pour une heure. Les échantillons ont alors été centrifugés à 8000 rpm pendant 30 secondes à 4 °C, le surnageant a été aspiré et les billes ont été lavées à trois reprises avec 1 ml de tampon de lyse (4 °C) et à une reprise avec 1ml de tampon kinase (20 mM Hepes pH 7,5, 10 mM MnCl₂ et 1mM DTT) à 4°C dans le but d'engendrer les conditions optimales pour l'essai kinase.

C) Essai kinase. La réaction enzymatique s'est déroulée dans 20 µl de tampon kinase supplémenté de 2 µCi de [γ -³²P]ATP pendant 20 minutes à 30 °C. Après que la réaction ait été arrêtée par l'ajout de tampon de solubilisation Laemmli 4X, les

échantillons ont été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant 10 %. Le gel était alors autoradiographié sur film kodak Biomax MR (Kodak) à -80°C. Les protéines contenues dans le gel ont finalement été transférées sur une membrane de nitrocellulose par électro-transfert semi-sec dans un appareil Semiphor (Pharmacia Biotech) dans le but d'immunodétecter Fyn et Yes par western Blot.

III-RÉSULTATS

1. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src induit l'apoptose dans les cultures de cellules C2C12 différenciées

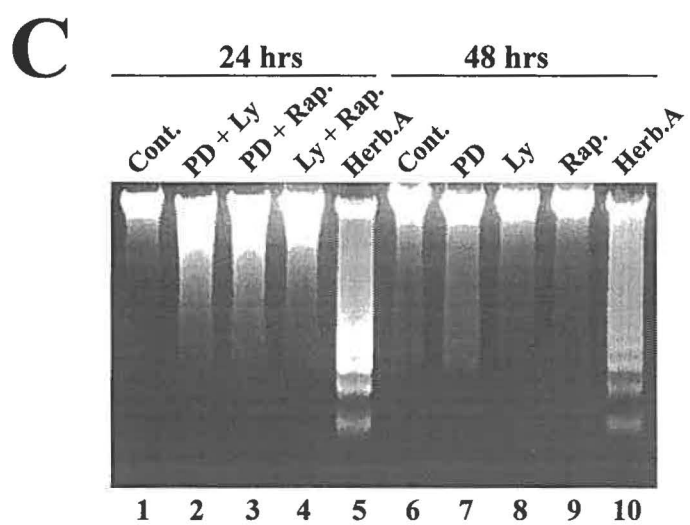
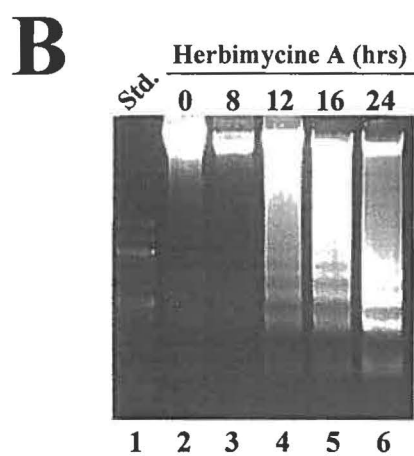
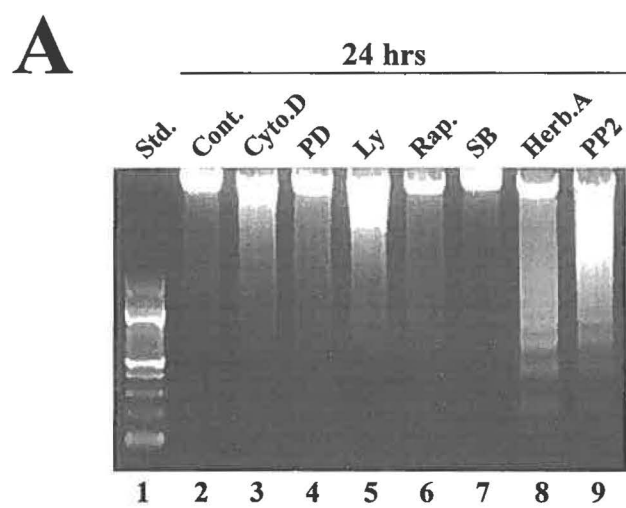
Dans le but d'identifier une ou des voies de signalisation importantes pour la survie des fibres musculaires squelettiques, nous avons utilisé différents inhibiteurs pharmacologiques inhibant des voies de signalisation reconnues pour promouvoir la survie dans d'autres types cellulaires. Grâce à cette stratégie, nous observons que l'herbimycine A, qui inhibe les tyrosines kinases de la famille Src, induit la fragmentation internucléosomique de l'ADN caractéristique à l'apoptose après 24 heures d'incubation (Fig. 11A piste 8). Le PP2 (inhibiteur spécifique des tyrosines kinases de la famille Src) a également été utilisé pour démontrer que l'apoptose induite par l'herbimycine A est vraiment due à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src (figure 11A piste 9). En présence d'herbimycine A, l'échelonnage d'ADN est sans équivoque à partir de 12 heures et s'intensifie jusqu'à 24 heures d'incubation (Fig. 11B). Les tyrosines kinases de la famille Src peuvent se trouver en amont à la fois des kinases MAP ERKs et de la PI-3kinase. Cependant, ni les kinases MAP ERKs ni la PI-3kinase ne sont nécessaires à la survie des cellules C2C12 différenciées, puisque leur inhibition par le PD 98059 20 μ M et le Ly 294002 5 μ M, respectivement, n'induit pas l'apoptose après 24 et 48 heures d'incubation (Fig. 11A piste 4,5 et C piste 7,8). De plus, l'inhibition simultanée de ces deux voies n'est pas suffisante pour induire l'apoptose (Fig. 11C piste 2). Ceci élimine la possibilité que

l'activité d'une de ces voies en aval des tyrosines kinases de la famille Src puisse compenser l'inhibition de l'autre. Finalement, la kinase d'adhésion focale (FAK), la kinase FRAP/mTOR et les kinases MAP p38 ne sont pas requises pour la survie des cellules C2C12 différenciées, puisque l'inhibition de ces voies n'induit pas l'apoptose chez ces dernières (Fig. 11A piste 3,6,7 et C piste 9). Notons également que l'inhibition simultanée des kinases MAP ERKs et de FRAP/mTOR n'affecte pas la survie des cellules C2C12 différenciées (Fig. 11C piste 3). Il en va de même lors de l'inhibition simultanée de la PI-3 kinase et de FRAP/mTOR (Fig. 11C piste 4). Donc, de toutes les voies étudiées, seules les tyrosines kinases de la famille Src semblent essentielles à la survie des cellules C2C12 différenciées.

2. L'apoptose due à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src est spécifique aux myotubes

Sachant que les myoblastes et les myotubes ont une régulation différentielle de leur survie à l'égard de l'adhésion cellulaire (voir introduction ; Vachon et al., 1996), nous avons vérifié s'il en était de même au niveau des voies de signalisation. Contrairement à ce qui est observé dans le cas des cultures de cellules C2C12 différenciées, la survie des myoblastes à sous-confluence n'est pas affectée par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et ce jusqu'à 48 heures d'incubation (Fig. 12A piste 3 et B piste 5). La survie des myoblastes à sous-confluence semble plutôt dépendante de l'activité kinases MAP ERKs. En effet,

Figure 11. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src induit l'apoptose des cellules C2C12 différenciées. (A,B et C) Analyse de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose (20 µg d'ADN/puit). Dans chaque cas, les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum et sont récoltées au sixième jour de post-confluence. (A) Des cellules C2C12 différenciées ont été incubées pendant 24 heures en présence de 1 µM de cytochalasine D (Cyto.D), 20 µM de PD 98059 (PD), 5 µM de Ly 294002 (Ly), 20 ng/ml de rapamycine (Rap.), 20 µM de SB 202190 (SB), 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) et 5 µM de PP2. L'herbimycine A et le PP2 causent l'apoptose des cellules C2C12 différenciées (piste 8 et 9). (B) Des cellules C2C12 différenciées ont été incubées avec 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) pendant divers temps compris entre 0 et 24 heures. La dégradation internucléosomique de l'ADN est apparente après douze heures d'incubation (piste 4-6). (C) Des cellules C2C12 différenciées ont été incubées avec différentes combinaisons d'inhibiteurs, soit 20 µM de PD 98059 + 5 µM de Ly 294002 (PD + Ly), 20 µM de PD 98059 + 20 ng/ml de rapamycine (PD + Rap.) et 5 µM de Ly 294002 + 20 ng/ml de rapamycine (Ly + Rap.) pendant 24 heures (pistes 1-5) ou avec 20 µM de PD 98059 (PD), 5 µM de Ly 294002 (Ly), 20 ng/ml de rapamycine (Rap.) et 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) pendant 48 heures (pistes 6-10). Aucune induction d'apoptose n'est observée dans ces conditions excepté en présence d'herbimycine A qui est utilisée comme contrôle positif d'apoptose. Autres abréviations : Std. = standard de poids moléculaire d'ADN, Cont. = cellules contrôle non-traitées.

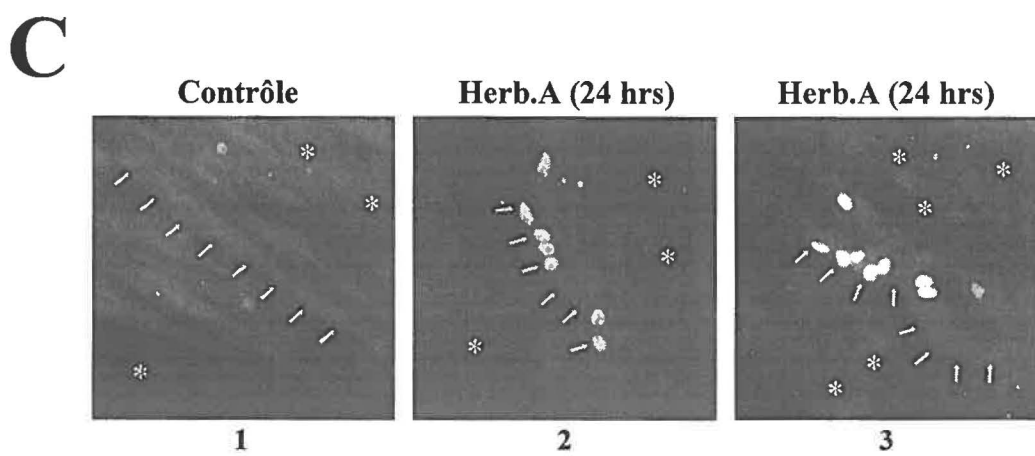
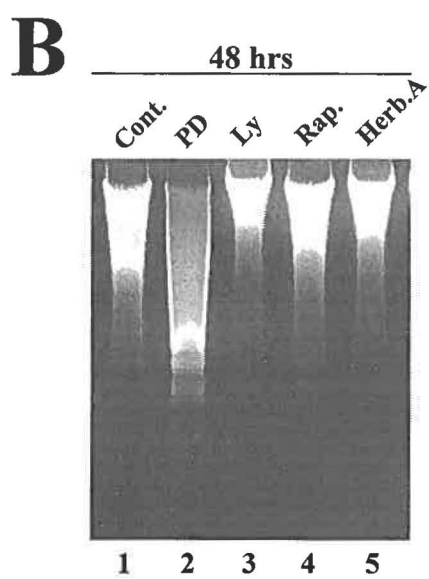
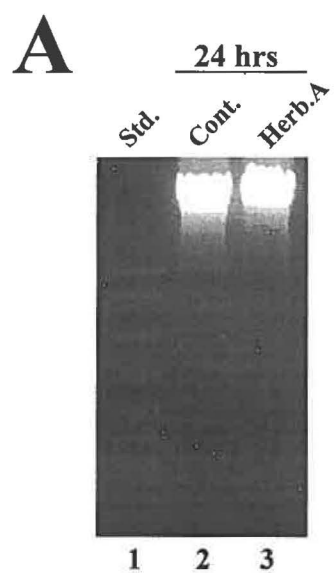


l'inhibition de ces dernières pendant 48 heures induit l'apoptose des myoblastes (Fig 12B piste 2). Ceci suggère donc que la promotion de la survie par les tyrosines kinases de la famille Src est spécifique aux myotubes, mais il est également possible que les myoblastes acquièrent une sensibilité par rapport à l'inhibition de ces kinases à post-confluence. Cette hypothèse est réfutée par le TUNEL *in situ* présenté à la figure 12C qui indique clairement que les noyaux positifs pour la dégradation d'ADN sont localisés exclusivement dans les myotubes. Finalement, notons que la survie des myoblastes n'est pas affectée par l'inhibition d'une durée de 48 heures de la PI-3 kinase et de FRAP/mTOR (Fig. 12B piste 3,4). Donc, à l'instar des composantes de l'adhésion cellulaire, la survie des myoblastes et des myotubes dépend de voies de signalisation différentes.

3. Les myoblastes et les myotubes exhibent des niveaux différentiels d'expression des tyrosines kinases Fyn et Yes

Suite à l'observation que les tyrosines kinases de la famille Src jouent un rôle dans la survie des myotubes spécifiquement, nous avons caractérisé l'expression de deux membres de cette famille de kinases, soit Fyn et Yes, chez les myoblastes et les myotubes isolés. La tyrosines kinase p60^{c-Src} semblait une candidate moins intéressante, puisque son activité dans les myotubes affecte le phénotype différencié (Castellani et al., 1995,1996). Cependant, cette hypothèse reste à démontrer. Les myotubes exhibent un niveau d'expression de Yes plus élevé que les myoblastes (Fig.

Figure 12. L'apoptose due à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src est spécifique aux myotubes. (A-B) Analyse de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose (20 µg d'ADN/puit). (A) Des myoblastes à sous-confluence cultivés dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum ont été incubés en absence (Cont.) ou en présence de 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) pendant 24 heures. La survie des myoblastes n'est pas affectée par ce traitement. (B) Des myoblastes à sous-confluence cultivés dans un milieu DMEM sans sérum ont été incubés pendant 48 heures en présence de 20 µM de PD 98059 (PD), 5 µM de Ly 294002 (Ly), 20 ng/ml de rapamycine (Rap.) et 1 µM d'herbimycine A (Herb.A). Le PD 98059 induit l'apoptose chez les myoblastes à sous-confluence. (C) TUNEL *in situ* effectué sur des cultures de cellules C2C12 différenciées (cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum) à 6 jour post-confluence en absence (1) ou en présence (2-3) de 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) pendant 24 heures. Les flèches délimitent un myotube alors que les astérisques ciblent des régions riches en myoblastes non-fusionnés. Les noyaux positifs pour la dégradation d'ADN se situent exclusivement dans les myotubes. Autres abréviations : Std. = standard de poids moléculaire d'ADN, Cont. = cellules contrôle non-traitées.



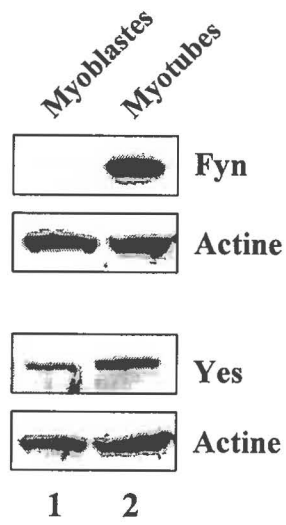
13A panneau inférieur). Tant qu'à elle, la tyrosine kinase Fyn est presque exclusivement exprimée dans les myotubes (Fig. 13A panneau supérieur). Dans les deux cas, le niveau d'expression de l'actine a été utilisé pour vérifier que des quantités de protéines totales similaires ont été analysées. La figure 13B indique que l'activité de Fyn dans les cultures de cellules C2C12 différenciées est beaucoup plus importante que dans les myoblastes à sous-confluence où elle est quasi indétectable. Cette figure montre également que le PP2 et l'herbimycine A, utilisés pour inhiber les tyrosines kinases Src, inhibent de façon importante l'activité de Fyn. Ainsi, les myotubes exhibent des niveaux d'expression plus élevés des tyrosines kinases Fyn et Yes que les myoblastes. De plus, l'activité de Fyn est presque exclusive aux myotubes.

4. L'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src

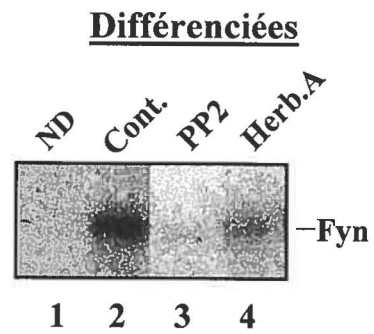
Dans le but de décortiquer les événements en aval de l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src dans l'apoptose des myotubes, nous avons vérifié le rôle potentiel des kinases MAP p38 dans ce processus. L'apoptose due à l'inhibition des kinases de la famille Src (Fig. 14A piste 6) est inhibée de façon dose dépendante par le SB 202190 (Fig. 14A piste 3-5). En effet, la dégradation internucléosomique de l'ADN est fortement atténuée à 5 μ M alors qu'elle est presque totalement bloquée à partir de 10 μ M de SB 202190 (Fig. 14A). Cependant, les inhibiteurs pharmacologiques sont limités par une spécificité qui n'est pas nécessairement

Figure 13. Les myoblastes et les myotubes montrent des niveaux d'expression différents des tyrosines kinases Fyn et Yes. (A) Des myoblastes à sous confluence et des myotubes isolés à partir de cultures cellulaires à 6 jours post-confluence ont été lysés dans le tampon Laemmli. Par la suite, 50 µg de lysat cellulaire ont été séparés sur gel de polyacrylamide 15 %, transférés sur une membrane de nitrocellulose et soumis à un immunobuvardage avec des anticorps spécifiques pour les tyrosines kinases Fyn et Yes. Un anticorps anti-actine a également été utilisé pour montrer que la quantité totale de protéine est comparable dans chaque échantillon. Les myotubes montrent des niveaux d'expression plus élevés des tyrosines kinases Fyn et Yes que les myoblastes. (B) Suite à son immunoprécipitation, l'activité de Fyn a été mesurée par auto-phosphorylation en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dans les cellules C2C12 non-différenciées (myoblastes) et différenciées. L'activité de Fyn est beaucoup plus importante des les cellules C2C12 différenciées que dans les myoblastes. L'activité dans les cellules C2C12 différenciées a également été mesurée en présence de 5 µM de PP2 et de 1 µM d'herbimycine A (Herb. A). Le PP2 et l'herbimycine A atténuent fortement l'activité de Fyn. En A et B, les myoblastes à sous-confluence et les C2C12 différenciées ont été cultivés dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum. Abréviation : ND = Myoblastes. Cont. = Cellules C2C12 différenciées non-traitées.

A



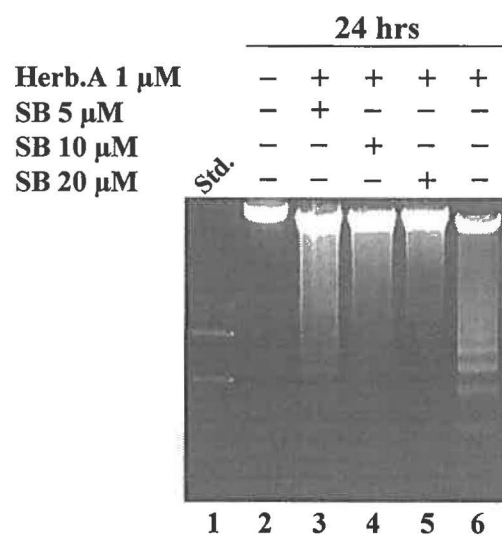
B



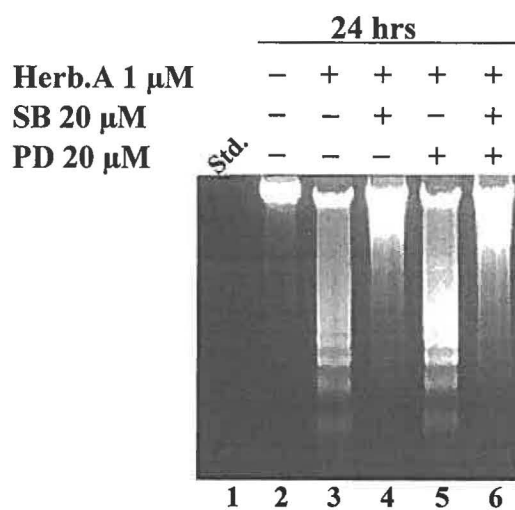
absolue. Par exemple, le SB 203580 (inhibiteur de p38 très similaire au SB 202190) peut activer la kinase Raf-1, qui se trouve en amont des kinases MAP ERKs, ainsi qu'inhiber les cyclooxygénases-1 et -2 (Börsch-Haubold et al., 1998 ; Hall-Jackson et al., 1999 ; Kalmes A. et al., 1999). Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'effet protecteur du SB 202190 n'était pas dû à une stimulation des kinases MAP ERKs, même si l'activité de celles-ci n'est pas requise pour la survie des myotubes. La figure 14B montre que le SB 202190 protège toujours contre l'apoptose même si la voie des kinases MAP ERKs est inhibée de façon concomitante. Comme contrôle, nous avons co-incubé le PD 98059 et l'herbimycine A, ce qui n'influence pas l'apoptose induite par cette dernière (Fig. 14B). Ces résultats excluent donc la possibilité que l'effet protecteur du SB 202190 soit dû à une stimulation des kinases MAP ERKs. Dans un deuxième temps, nous avons démontré que la protection contre l'apoptose conférée par le SB 202190 n'est pas due à l'inhibition des cyclooxygénases-1 et -2. En effet, l'inhibition des cyclooxygénases-1 et -2 par l'indométacine ne parvient pas à bloquer l'apoptose induite par l'herbimycine A (Fig. 14C piste 5). Notons également que l'indométacine et le NS 398, un inhibiteur de la cyclooxygénase-2, employés seuls n'influencent pas la survie des cellules C2C12 différenciées (Fig. 14C piste 3,4). Mis ensembles, ces résultats indiquent que les kinases MAP p38 sont nécessaires à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src.

Figure 14. Les MAP kinases p38 sont nécessaires à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. (A,B et C) Analyse de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose (20 µg d'ADN/puit). Dans chaque cas, les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum et sont récoltées au sixième jour de post-confluence. (A) Des cultures de cellules C2C12 différenciées ont été exposées pendant 24 heures à une concentration de 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) en absence ou en présence d'une concentration croissante de SB 202190 (SB) (5 µM à 20 µM). Le SB 202190 inhibe de façon dose dépendante l'apoptose induite par l'herbimycine A. (B) Des cultures de cellules C2C12 différenciées ont été incubées pendant 24 heures avec 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) en absence ou en présence de 20 µM de SB 202190 (SB), de 20 µM de PD 98059 (PD) ou de ces deux inhibiteurs à la fois. L'inhibition de l'apoptose par le SB 202190 perdure en présence du PD 98059. Ce dernier n'inhibe pas l'apoptose, induite par l'herbimycine A, lorsqu'il est employé seul. (C) Des cultures de cellules C2C12 différenciées ont été exposées pendant 24 heures à une concentration de 1 µM d'herbimycine A (Herb.A) en absence ou en présence de 1 µM d'indométacine (Indo.). L'indométacine n'influence pas l'apoptose induite par l'herbimycine A. L'indométacine (1 µM) et le NS 398 (10 µM) ont également été utilisés en absence d'herbimycine A. Ces deux traitements sont sans effet au niveau de la survie des cellules C2C12 différenciées. Abréviation : Std.= standard de poids moléculaire d'ADN.

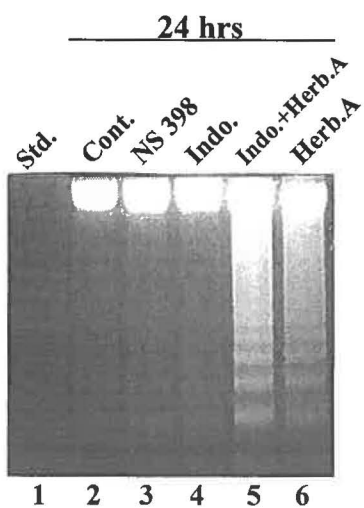
A



B



C

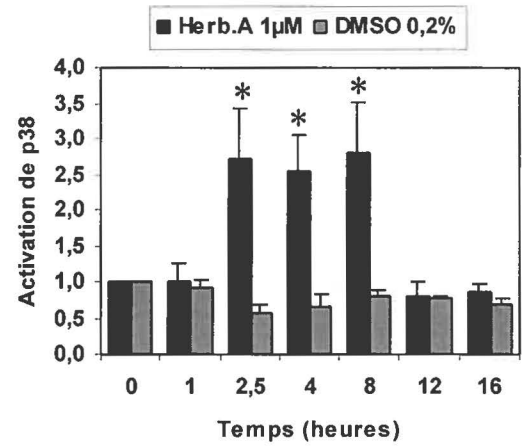
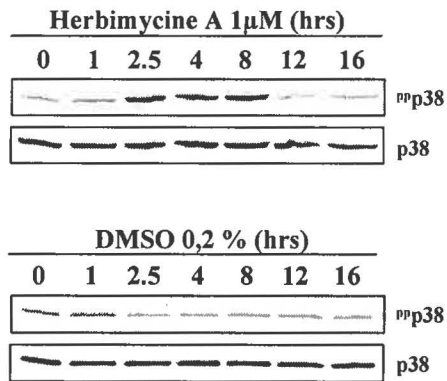


5. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src active les kinases MAP p38 dans les myotubes.

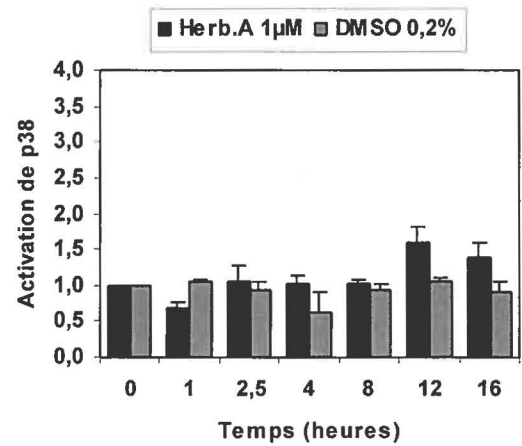
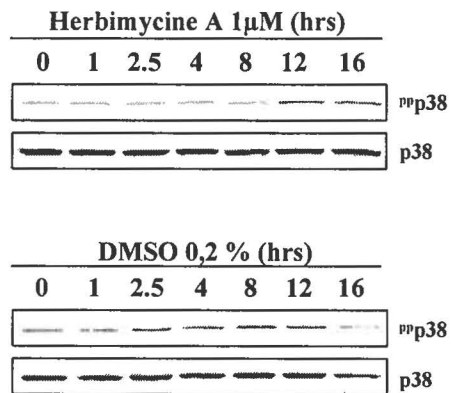
Dans le but de démontrer le rôle des kinases MAP p38 dans l'apoptose des myotubes, nous avons étudié leur activation lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src. Comme le montre la figure 15A, l'herbimycine A induit une activation de près de trois fois des kinases MAP p38 dans les myotubes isolés après 2,5 heures d'incubation. Cette activation est maintenue jusqu'à 8 heures d'incubation avec l'herbimycine A, après quoi le niveau d'activation des kinases MAP p38 est comparable à celui retrouvé dans les cellules contrôles. Toutefois, la quantité totale de p38 n'est pas affectée par l'herbimycine A (Fig. 15A panneau supérieur). Par la suite, nous avons démontré que l'effet observé n'est pas dû au DMSO, utilisé pour dissoudre l'herbimycine A, en effectuant la même cinétique en utilisant seulement ce dernier. Effectivement, cette cinétique ne montre aucune activation de p38 (Fig. 15A panneau inférieur). L'activation des kinases MAP p38, s'étalant de 2,5 à 8 heures, observée dans les myotubes n'a pas lieu dans les myoblastes où l'herbimycine A ne cause pas l'apoptose (Fig. 15B panneau supérieur). Dans ce cas également le DMSO n'amène aucune modulation importante de l'activation des kinases MAP p38 (Fig. 15B panneau inférieur). Ainsi, l'activation des kinases MAP p38 est spécifique aux myotubes où l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src induit l'apoptose.

Figure 15. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src active les MAP kinases p38 dans les myotubes. Des cultures de cellules C2C12 différenciées à 6 jours post-confluence ou de myoblastes à sous-confluence ont été incubées pendant divers temps (0 à 16 heures) dans un milieu DMEM contenant 1 % de contenant 1 μ M d'herbimycine A (Herb.A) ou de 0,2 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Par la suite, la forme active de p38, contenue dans les myotubes isolés (A) ou dans les myoblastes à sous-confluence (B), est détectée par Western Blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme doublement phosphorylée. Après déshybridation, la quantité totale de p38 est déterminée par l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la partie de C-terminal des MAP kinases p38 (A et B). L'activation des MAP kinases p38 est uniquement détectable dans les myotubes isolés incubés en présence d'herbimycine A. Cette activation s'étale de 2,5 à 8 heures d'incubation. Dans les histogrammes, l'activation des MAP kinases p38 est donnée par les quantités relatives de la forme active sur la quantité totale ($n = 3$). Les astérisques indiquent les valeurs significativement différentes du contrôle ($0,001 \leq p \leq 0,05$).

A Myotubes



B Myoblastes



6. L'activité des protéines kinases C n'est pas essentielle à la survie des cellules C2C12 différenciées

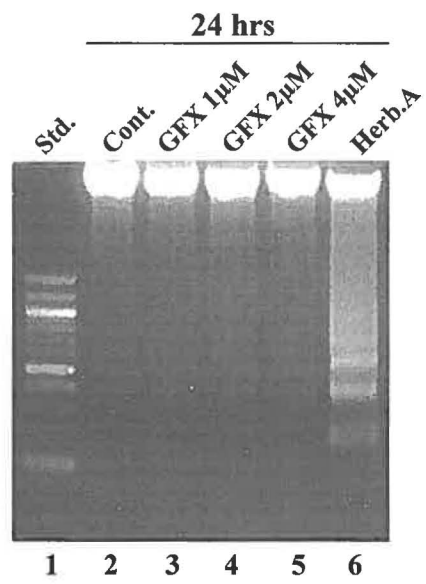
L'inhibition des protéines kinases C (PKCs) active les kinases MAP p38 dans certains types cellulaires où ces dernières sont essentielles à l'apoptose. De plus, il a été rapporté que la staurosporine, qui inhibe entre autre les PKCs, induit l'apoptose dans les cultures de cellules C2C12 différenciées (Maglara et al., 1998). Nous avons donc voulu vérifier si les PKCs pourraient agir en aval des tyrosines kinases de la famille Src et contribuer à la survie des myotubes. Nos résultats indiquent que l'inhibition à large spectre des PKCs par le GF 101203X et le Go 6983 ne suffit pas à induire l'apoptose après 24 heures d'incubation et ce jusqu'à des concentrations deux fois plus élevées que ce qui est normalement utilisé dans la littérature (Fig. 16A et B). Donc, l'activité des PKCs n'est pas déterminante pour la survie des myotubes, contrairement à l'activité des tyrosines kinases de la famille Src.

7. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 affecte les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 Bcl-X_L et Bcl-2, ainsi que de la protéine anti-apoptotique Bag-1

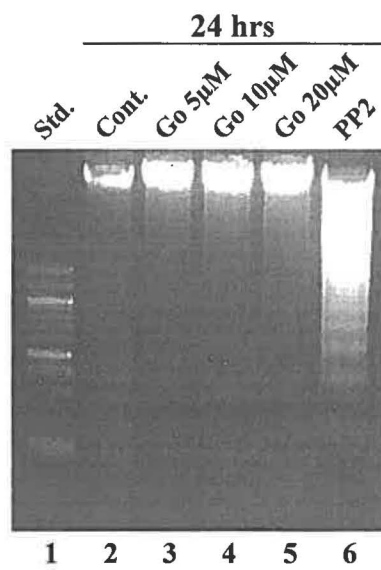
Dans le but de voir comment les voies des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 influencent les régulateurs de l'apoptose, nous avons étudié les niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 lors de l'inhibition de ces

Figure 16. L'activité des protéines kinases C n'est pas essentielle à la survie des C2C12 différenciées. (A et B) Analyse de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose (20 µg d'ADN/puit). Dans chaque cas, les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum et sont récoltées au sixième jour de post-confluence. (A) Des cultures de cellules C2C12 différenciées ont été incubées pendant 24 heures en présence de concentrations croissantes de GF109203X (GFX) (1 à 4 µM). Le GF109203X n'induit pas l'apoptose des cellules C2C12 différenciées. L'herbimycine A (Herb.A) 1 µM est utilisée comme contrôle positif d'apoptose. (B) Des cultures de cellules C2C12 différenciées ont été incubées pendant 24 heures en présence de concentrations croissantes de Go6983 (Go) (5 à 20 µM). Le Go6983 n'induit pas l'apoptose des cellules C2C12 différenciées. Le PP2 5 µM est utilisé comme contrôle positif d'apoptose. Abréviations : Std. = standard de poids moléculaire d'ADN, Cont. = cellules contrôles non-traitées.

A



B



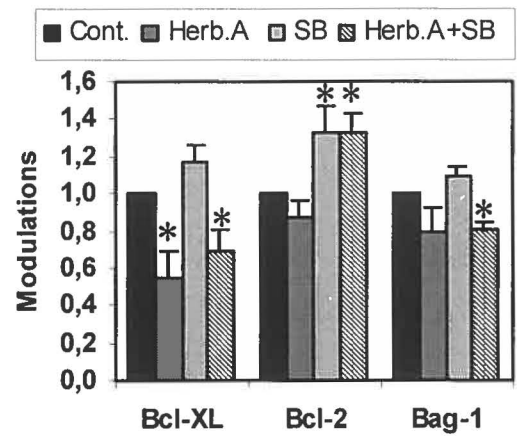
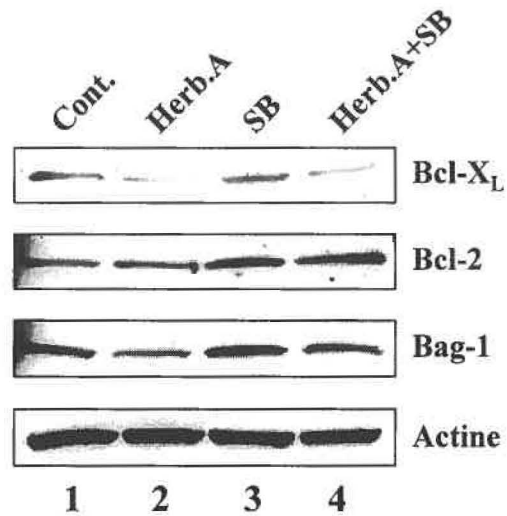
voies. Les niveaux d'expression de la protéine Bcl-X_L, qui ne sont pas affectés par l'inhibition des kinases MAP p38, diminue de 45 % lors de l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src (Fig. 17A). Cette baisse est maintenue lorsque les kinases MAP p38 sont inhibées de façon concomitante et ce malgré le fait que l'apoptose soit atténuée (Fig. 17A). Un comportement tout à fait similaire est observé dans le cas de la protéine Bag-1 où la diminution (23 %) est toutefois moins importante (Fig. 17A). Les niveaux d'expression de la protéine Bcl-2 ne semblent pas modulés significativement par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. Par contre, l'inhibition des kinases MAP p38 amène une augmentation de 23 % de Bcl-2. Cette augmentation perdure lorsque les tyrosines kinases de la famille Src sont inhibées simultanément (Fig. 17A). D'un autre côté, les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques étudiés, soit Bad, Bak et Bax, ne sont pas affectés par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src, des kinases MAP p38 ou de ces deux voies simultanément (Fig. 17B). Ainsi, l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 affecte de façon indépendante le niveau d'expression des homologues Bcl-2.

8. L'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes

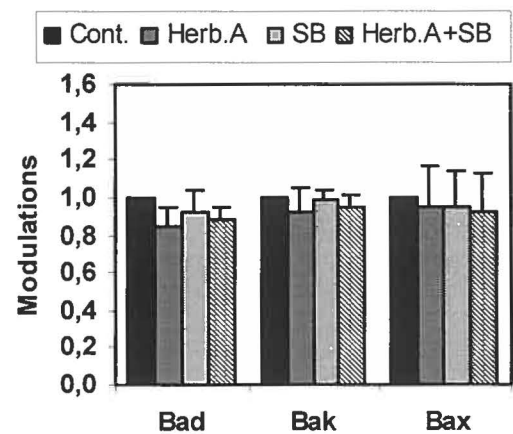
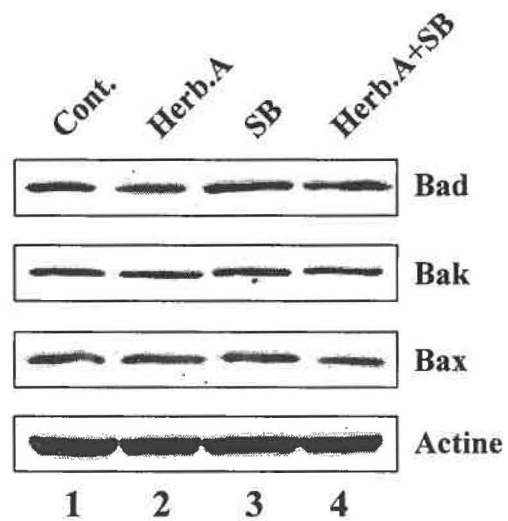
Étant donné que l'activité des kinases MAP p38 est essentielle à l'apoptose des myotubes due à l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src, nous avons vérifié l'implication potentielle des kinases MAP p38 dans l'anoïkose des myotubes.

Figure 17. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des MAP kinases p38 affecte les niveaux d'expression de Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1. Des cultures de cellules C2C12 différenciées, cultivées dans un milieu DMEM supplémenté de 1 % de sérum, ont été incubées pendant 24 heures en présence de 1 μ M d'herbimycine A (Herb.A), de 20 μ M de SB 202190 (SB) ou en présence de ces deux inhibiteurs simultanément (Herb.A + SB). Les myotubes isolés de ces cultures au sixième jour post-confluence ont été solubilisés dans le tampon Laemmli. Par la suite, 50 μ g de protéines ont été résolus sur gel de polyacrylamide 15 % et transférés sur une membrane de nitrocellulose. (A) Les membranes ont été hybridées avec des anticorps spécifiques dirigés contre Bcl-2, Bcl-X_L, et Bag-1. Le niveau d'expression de Bcl-2 et Bag-1 est diminué en présence d'herbimycine A. Cette baisse d'expression est maintenue en présence du SB 202190. Pour sa part, le niveau d'expression de Bcl-2 augmente en présence du SB 202190. Cette hausse est préservé en présence d'herbimycine A. (B) Les membranes ont été hybridées avec des anticorps spécifiques dirigés contre Bad, Bak et Bax. Le niveau d'expression de ces trois protéine n'est pas affecté par la présence d'herbimycine A (Herb.A), de SB 202190 ou de ces deux inhibiteurs à la fois. Dans les histogramme (A et B), les modulations sont données par le ratio de la valeur densitométrique des échantillons traités sur la valeur du contrôle non-traité (n = 3). Les astérisques indiquent les valeurs significativement différentes du contrôle ($0,001 \leq p \leq 0,05$).

A Anti-apoptotiques



B Pro-apoptotiques

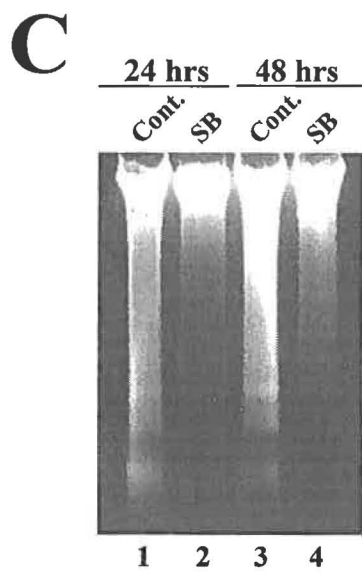
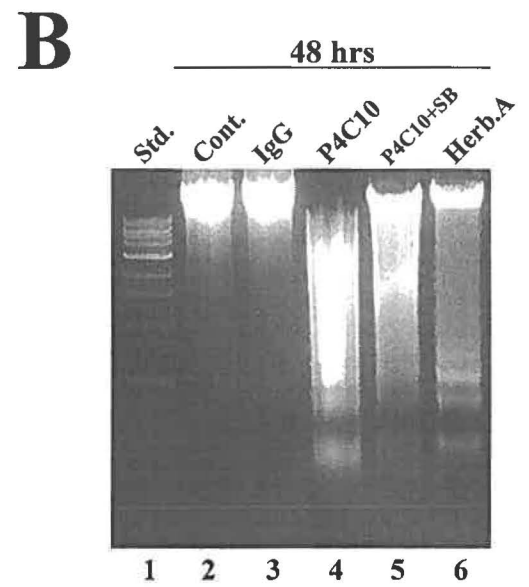
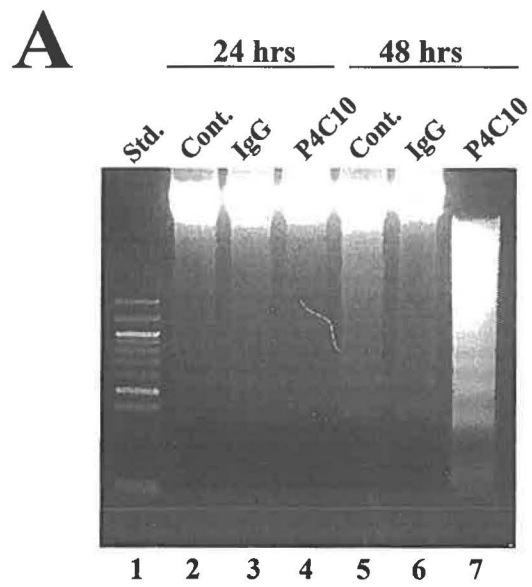


Pour ce faire, nous avons utilisé deux modèles d'anoïkose. Premièrement, l'anticorps P4C10 qui bloque le domaine extracellulaire de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines. Deuxièmement, nous avons utilisé les cellules C2C12.B4/plam qui permettent d'étudier spécifiquement l'anoïkose des myotubes due à l'absence de mérosine telle qu'observée dans la MCMD. Le blocage du domaine extracellulaire de la sous-unité $\beta 1$ ($\beta 1D$ dans le cas des myotubes) des intégrines induit l'anoïkose des cellules C2C12 différenciées après 48 heures d'incubation (Fig. 18A piste 7). À ce temps, les cellules sont complètement arrondies et détachées du pétri. L'effet de l'anticorps P4C10 est spécifique, puisque des IgG purifiés à partir d'un sérum non-immun de souris sont sans effet sur la survie cellulaire et ce jusqu'à 48 heures d'incubation (Fig. 18A piste 3,6). Un délai assez important est nécessaire avant que l'effet de l'anticorps P4C10 se fasse sentir, puisqu'après 24 heures d'incubation ni la morphologie ni la survie cellulaire ne sont affectées (Fig. 18A piste 4). L'anoïkose induite par l'anticorps P4C10 est fortement atténuée par l'inhibition des kinases MAP p38 avec le SB 202190 (Fig. 18B piste 5). De façon similaire, l'anoïkose induite par le manque de mérosine chez les cellules C2C12.B4/plam est totalement inhibée par l'inhibition des kinases MAP p38 par le SB 202190 et ce après 24 et 48 heures d'incubation (Fig. 18C piste 2 et 4). Donc, l'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes due à la perturbation de la liaison $\alpha 7\beta 1D$ -mérosine.

Figure 18. L'activité des MAP kinases p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes. (A, B et C) Analyse de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose (20 µg d'ADN/puit). Dans chaque cas, les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum et sont récoltées au sixième jour de post-confluence.

(A) Des cultures de C2C12 différenciées ont été incubées en présence de 100 µg/ml d'IgG purifiés à partir d'un sérum non-immun de souris (IgG) ou en présence de 100µg/ml d'anticorps P4C10 pendant 24 heures (piste 3-4) et 48 heures (piste 6-7). Contrairement aux IgG purifiés à partir d'un sérum non-immun de souris, l'anticorps P4C10 induit l'anoïkose après 48 heures d'incubation. (B) Des C2C12 différenciées ont été mises en présence de 100 µg/ml d'IgG purifiés à partir d'un sérum non-immun de souris (IgG), de 100 µg/ml de l'anticorps P4C10 ou en présence de 100 µg/ml d'anticorps P4C10 et de 20 µM de SB 202190 pendant 48 heures (P4C10 + SB). L'herbimycine A (Herb.A) est utilisée comme contrôle positif. L'anoïkose induite par l'anticorps P4C10 est fortement atténuée par le SB 202190. (C) Des cultures de C2C12.B4/plam différenciées ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de SB 202190 (SB) pendant 24 et 48 heures. Le SB 202190 inhibe l'anoïkose des myotubes due à l'absence de mérosine après 24 et 48 heures d'incubation.

Abréviations : Std. = standard de poids moléculaire d'ADN, Cont = cellules contrôles non-traitées.

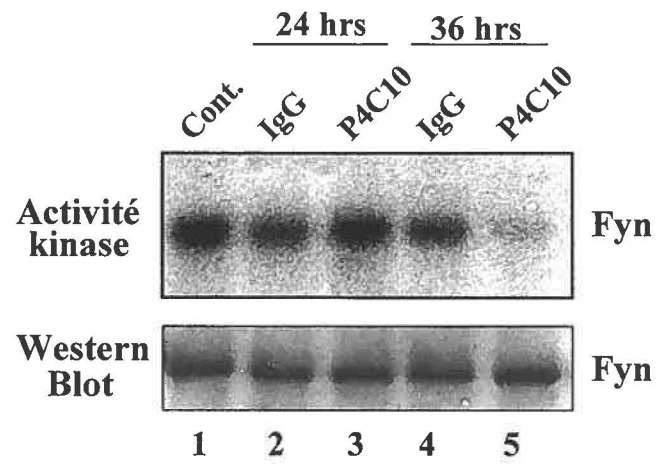


9. L'activité de la tyrosine kinase Fyn chute lors de l'anoïkose des myotubes

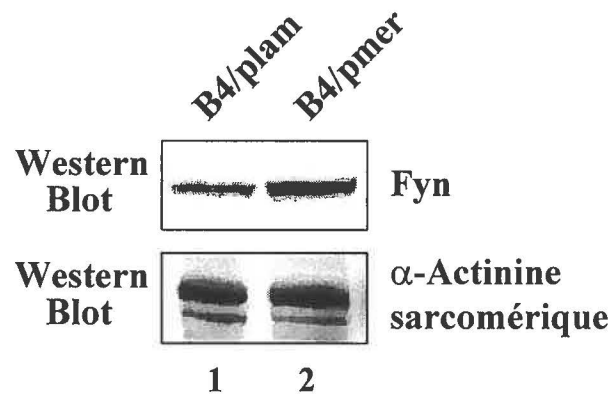
Dans le but de vérifier si la perte d'activité de Fyn pourrait être à la base de l'anoïkose des myotubes due à l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, nous avons analysé son expression et son activité dans nos deux modèles d'anoïkose, soit l'anticorps P4C10 et les cellules C2C12.B4/plam différenciées. Après 36 heures d'incubation avec l'anticorps P4C10, alors que les cellules sont arrondies et commencent à se détacher, l'activité de Fyn est très fortement diminuée comparativement à l'activité retrouvée dans les cellules contrôles (Fig. 19A piste 5). Pour démontrer la spécificité de l'anticorps P4C10 sur l'activité de Fyn, nous avons utilisé des IgG purifiés à partir d'un sérum non-immun de souris. Ceux-ci affecte très peu l'activité Fyn après 24 et 36 heures (Fig. 19A piste 2 et 4). Suite à une incubation de 24 heures avec l'anticorps P4C10, les cellules (myoblastes et myotubes) demeurent étalées et l'activité de Fyn inchangée (Fig. 19A piste 3). L'incubation avec l'anticorps P4C10 ou les IgG n'affecte pas les niveaux d'expression de Fyn (Fig. 19A). Comme le montre la figure 19B, l'absence de mérosine affecte les niveaux d'expression de Fyn ; en effet les cellules C2C12.B4/plam exhibent un niveau d'expression de Fyn moins important que les C2C12.B4/pmer. Puisque les niveaux d'expression de Fyn dans les cultures de cellules différenciées est intimement relié au nombre de myotubes, l'expression de l' α -actinine sarcomérique (spécifique aux myotubes) a été analysée pour vérifier que la quantité de myotubes est équivalente dans chaque échantillon (Fig. 19B). Cette baisse des niveaux de Fyn est accompagnée d'une baisse d'activité équivalente dans les cellules C2C12.B4/plam par rapport à ce

Figure 19. L'activité de la tyrosine kinase Fyn chute lors de l'anoïkose des myotubes. (A) Fyn a été immunoprécipitée à partir de lysats de C2C12 différenciées incubées pendant 24 et 36 heures en présence de 100 µg/ml d'IgG purifiés à partir d'un sérum non-immun de souris (IgG) ou en présence de 100µg/ml d'anticorps P4C10. Suite à cette immunoprécipitation, l'activité de Fyn est déterminée par auto-phosphorylation en présence de [γ -³²P]ATP. Une fraction des immunoprécipités est conservée dans le but de déterminer, par Western Blot, si la quantité de Fyn est équivalente dans chaque échantillon. L'activité de Fyn chute de 60 % suite à une incubation de 36 heures avec l'anticorps P4C10. (B) Le niveau d'expression de Fyn a été étudié par Western Blot en absence et en présence de mérosine dans les C2C12.B4/plam différenciées (B4/plam) et dans les C2C12.B4/pmer différenciées (B4/pmer) respectivement. Un anticorps anti- α -actinine a été utilisé pour démontrer que la quantité de myotubes est équivalente dans chaque échantillon. Le niveau d'expression de Fyn dans les C2C12.B4/pmer est 1,9 fois supérieur à celui retrouvé dans les C2C12.B4/plam. (C) L'activité de Fyn a été déterminée par auto-phosphorylation suite à son immunoprécipitation en absence et en présence de mérosine dans les C2C12.B4/plam (B4/plam) différenciées et dans les C2C12.B4/pmer différenciées (B4/pmer) respectivement. L'absence de mérosine est accompagnée d'une baisse d'activité de Fyn (1.9 fois). En A,B et C les cellules, cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum, ont été lysées au sixième jour post-confluence. Abréviation : Cont = cellules contrôles non-traitées.

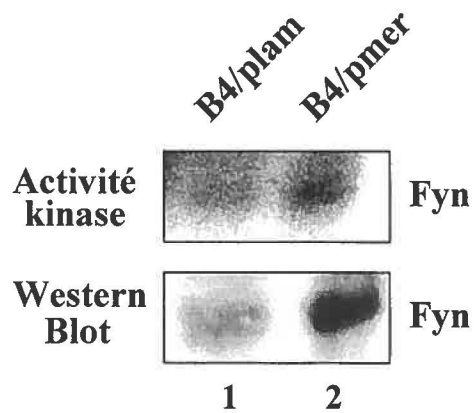
A



B



C



qui est observé dans les cellules C2C12.B4/pmer (Fig. 19C). Ainsi, la baisse d'activité de Fyn corrèle avec l'altération du système d'adhésion $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine.

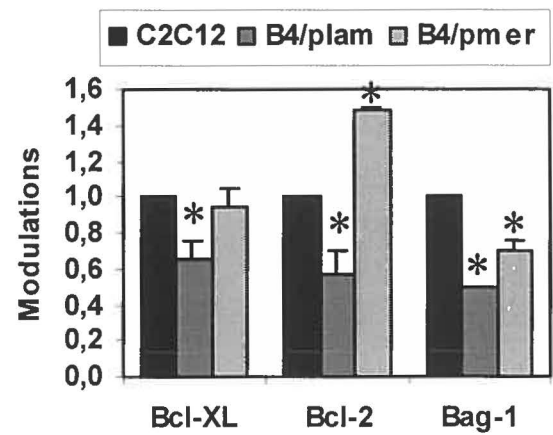
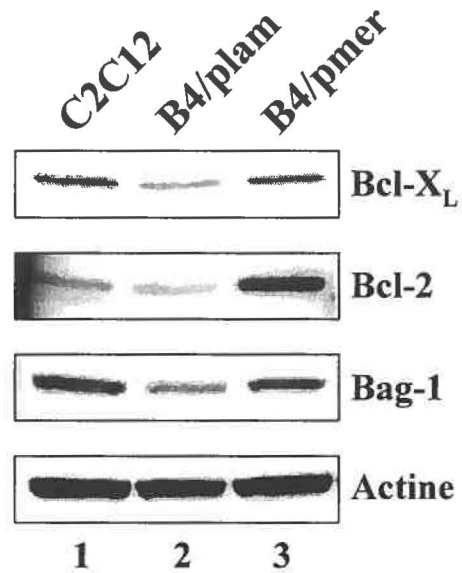
10. L'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1 chute, alors que celle du pro-apoptotique Bax, augmente en absence de mérosine

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de l'anoïkose musculaire due à l'absence de mérosine, nous avons comparé les niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 et de la protéine anti-apoptotique Bag-1 en présence et en absence de mérosine. L'absence de mérosine cause une diminution de l'expression de Bcl-X_L. En effet, les niveaux d'expression chez les myotubes C2C12.B4/plam sont 33 % inférieur à ceux retrouvés dans les myotubes C2C12 (Fig. 20A). De plus, l'expression de Bcl-X_L est partiellement restaurée dans les C2C12.B4/pmer (Fig. 20A). La différence dans les niveaux d'expression de Bcl-X_L chez les myotubes C2C12.B4/plam et les myotubes C2C12.B4/pmer indique que l'effet de la mérosine est spécifique, puisque ces derniers expriment la mérosine sans toutefois exprimer la laminine-1. Un comportement tout à fait semblable est observé dans le cas de Bag-1, où la diminution d'expression dans les C2C12.B4/plam est de 50 % (Fig. 20A). Dans le cas de Bcl-2, il y a également chute d'expression en absence de mérosine chez les myotubes C2C12.B4/plam (44 %). Cependant, nous observons une surexpression de Bcl-2 chez les myotubes C2C12.B4/pmer (Fig. 20A). L'expression du pro-apoptotique Bax augmente de 41 % chez les myotubes C2C12.B4/plam par rapport

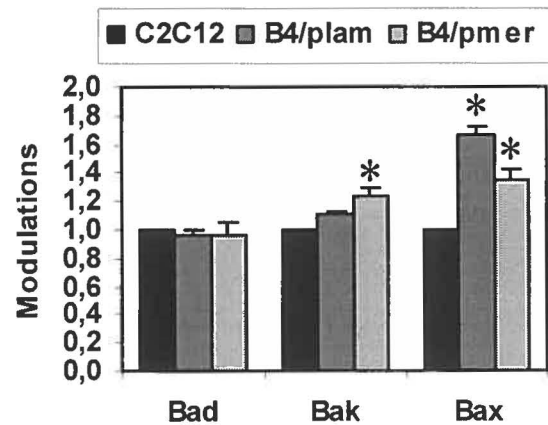
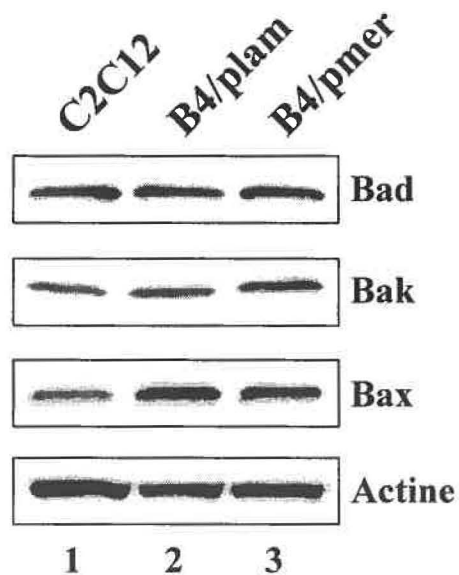
aux niveaux contrôle dans les myotubes C2C12 (Fig. 20B). Les niveaux de Bax sont également augmentés dans les C2C12.B4/pmer. Cette augmentation (23 %) est toutefois moins importante que chez les myotubes C2C12.B4/plam. Enfin, les niveaux d'expression des pro-apoptotiques Bad et Bak ne sont pas modulés en absence de mérosine (Fig. 20B). Par contre, les niveaux d'expression de Bak sont légèrement, mais significativement, augmentés chez les myotubes C2C12.B4/pmer (Fig. 20B). Ainsi, l'absence de mérosine cause des modulations d'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2, ainsi que de la protéine Bag-1 tout comme lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src et des kinases MAP p38. En absence de mérosine, la régulation est toutefois plus complexe puisque les niveaux du pro-apoptotique Bax sont également affectés.

Figure 20. L'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1 chute alors que celle du pro-apoptotique Bax augmente en absence de mérosine. Des cultures de C2C12, de C2C12.B4/plam (B4/plam) et de C2C12.B4/pmer (B4/pmer), toutes cultivées dans un milieu DMEM supplémenté de 1 % de sérum, ont été lysées dans le tampon Laemmli au sixième jour post-confluence. Par la suite, 50 µg de protéines ont été séparés sur gel de polyacrylamide 15 % et transférés sur une membrane de nitrocellulose. (A) Les membranes ont été hybridées avec des anticorps spécifiques dirigés contre Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1. Un anticorps anti-actine est utilisé pour montrer que la quantité totale de protéine est équivalente dans chaque échantillon. L'absence de mérosine amène une baisse d'expression de Bcl-X_L et Bcl-2. (B) Les membranes ont été hybridées avec des anticorps spécifiques dirigés contre Bad, Bak et Bax. Un anticorps anti-actine est utilisé pour montrer que la quantité totale de protéine est équivalente dans chaque échantillon. Le niveau d'expression de Bax augmente en absence de mérosine. Dans les histogrammes, les modulations d'expression sont données par le ratio de la valeur densitométrique obtenue chez les C2C12.B4/plam ou chez les C2C12.B4/pmer sur la valeur obtenue chez les C2C12 (n = 3). Les astérisques indiquent les valeurs significativement différentes du contrôle ($0,001 \leq p \leq 0,05$).

A Anti-apoptotiques



B Pro-apoptotiques



IV – DISCUSSION

Étant donné que le système d'adhésion cellulaire $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine joue un rôle critique et spécifique au niveau de la survie des myotubes, nous avons émis l'hypothèse que ce dernier génère une signalisation spécifiquement impliquée dans la survie des myotubes. L'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine affecterait donc des voies de signalisation responsables de l'induction de l'anoïkose musculaire. Dans la présente étude, nous avons cherché à déterminer 1) les voies de signalisation, activées par le système d'adhésion $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, responsables de la survie des myotubes, 2) les voies de signalisation, activées lors de la perte du lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, impliquées dans l'anoïkose des myotubes et (3) les mécanismes moléculaires de régulation de l'anoïkose des myotubes en étudiant la modulation des niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques en absence de mérosine. Nous avons d'abord démontré que les tyrosines kinases de la famille Src jouent un rôle critique et spécifique au niveau de la survie des myotubes. Nos résultats démontrent également que les kinases MAP p38 sont essentielles à la progression de l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. Ces deux voies de signalisation contrôlent l'entrée en apoptose en modulant, entre autre, les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-2 ainsi que de la protéine anti-apoptotique Bag-1. De plus, nous avons clairement démontré que les kinases MAP p38 sont également impliquées dans l'anoïkose des myotubes due à l'absence de mérosine. Toujours selon nos résultats, il existe une corrélation évidente entre le lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine, l'activité de la tyrosine

kinase Fyn et la survie des myotubes. Finalement, nous avons montré que l'absence de mérosine amène des modulation d'expression de Bcl-2, Bcl-X_L, Bag-1 et Bax.

1. Les tyrosines kinases de la famille Src jouent un rôle critique et spécifique au niveau de la survie des myotubes

Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, nous avons d'abord démontré que la survie des cellules C2C12 différenciées est dépendante de l'activité des tyrosines kinases de la famille Src. Cette famille de kinase a été souvent associée à la survie des cellules du système immunitaire (Katagiri et al., 1996 ; Yousefi et al., 1996 ; Al-Ramadi et al., 1998 ; Qin et al., 1998). Cependant, très peu d'études font état d'une implication des tyrosines kinases Src dans la survie de cellules provenant de tissus. De plus, nous avons clairement établi que la survie des cellules C2C12 différenciées est indépendante de l'activité des kinases MAP ERKs et de la PI-3 kinase. Nos résultats démontrent également que la promotion de la survie par les tyrosines kinases de la famille Src est exclusive aux myotubes. En effet, l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src n'affecte pas la survie des myoblastes qui semble plutôt dépendante de l'activité des kinases MAP ERKs. Donc, à l'instar des composantes de l'adhésion cellulaire, la survie des myoblastes et des myotubes dépend de voies de signalisation différentes. La régulation différentielle de la survie des myoblastes et des myotubes à l'égard des kinases MAP ERKs s'accorde avec la forte atténuation de l'activité de ces kinases au cours de la différenciation myogénique

(Rammel et al., 1999 ; Solhonne et al., 1999). Par contre, une étude récente a démontré que l'activité de la kinase Akt, qui se trouve souvent en aval de la PI-3 kinase, est importante pour la survie des cellules C2C12 (Fujio et al., 1999). Notons cependant que cette étude a été effectuée au moment où les myoblastes sortent du cycle cellulaire et commencent à fusionner. Pour notre part, nous n'avons pas étudié les voies de signalisation importantes pour la survie à cette étape de la différenciation myogénique. Il est donc possible que des voies de signalisation différentes soient responsables de la survie des cellules musculaires dans les trois grandes étapes de la différenciation myogénique, soit la prolifération des myoblastes, la fusion des myoblastes et la stabilisation des myotubes. D'autres part, notre observation que l'inhibition de la PI-3 kinase n'induit pas l'apoptose des cellules C2C12 différenciées n'exclue pas la possibilité que la kinase Akt puisse jouer un rôle actif dans la survie. En effet, l'activation d'Akt est souvent indépendante de la PI-3 kinase dans les fibres musculaires (Somwar et al., 1998 ; Kim et al., 1999 ; Kurowski et al., 1999). De plus, ILK-1 («Integrin-linked kinase-1»), dont l'activité peut être influencée par les tyrosines kinases de la famille Src (Parsons et Parsons, 1997), peut activer Akt de façon indépendante de la PI-3 kinase (Dedhar, 2000). Jusqu'à présent, très peu d'informations sont disponibles concernant les voies de signalisation impliquées dans la survie des myotubes. Cependant, il a été rapporté que la staurosporine, qui inhibe entre autre les PKCs, induit l'apoptose dans les cellules C2C12 différenciées y compris dans les myotubes (Maglara et al., 1998). Toutefois, nous n'observons pas d'apoptose suite à l'inhibition des PKCs dans les cellules C2C12 différenciées. L'induction de l'apoptose par la staurosporine dans les myotubes pourrait alors être

due à l'inhibition des tyrosines kinases Src, tel qu'observé dans cette étude. Effectivement, la staurosporine est également un inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases (Ohmichi et al., 1992 ; Fallon et al., 1994 ; Zhu et al., 1999). Suite à notre observation que les tyrosines kinases Src jouent un rôle critique et spécifique dans la promotion de la survie des myotubes, nous nous sommes également intéressés à l'expression de ces kinases dans les myoblastes et les myotubes isolés. Cependant, la tyrosine kinase p60^{c-Src} nous semblait être une candidate peu intéressante pour les objectifs de la présente étude. En effet, celle-ci stimule la prolifération des myoblastes et empêche leur fusion (Kim et al., 1992 ; Hase et al., 1996). De plus, il a été démontré que l'activation de v-Src, analogue à p60^{c-Src}, dans les myotubes amène une réorganisation très importante du cytosquelette (Castellani et al., 1995,1996). Cette réorganisation du cytosquelette perturbe l'intégrité des myofibrilles qui constituent les éléments clés du phénotype différencié des fibres musculaires. Donc, contrairement à la survie qui demande une constante activation, l'activité de p60^{c-Src} dans les myotubes se doit d'être étroitement régulée et se manifester seulement lorsqu'une réorganisation du cytosquelette s'impose. Ceci reste à être démontré, mais nous avons tout de même concentré notre étude au niveau de l'expression des deux autres tyrosines kinases de la famille Src exprimées par le tissu musculaire, soit Fyn et Yes (Bolen et Brugge, 1997). Cette étude nous a permis d'établir que la tyrosine kinase Yes est plus abondante dans les myotubes que dans les myoblastes. Nous avons également démontré que l'expression et l'activité de Fyn sont pratiquement exclusives aux myotubes. De plus, l'activité de Fyn est fortement inhibée par les deux inhibiteurs de tyrosines kinases de la famille Src que nous avons utilisé, soit

l'herbimycine A et le PP2. Donc, puisque la promotion de la survie par les tyrosines kinases de la famille Src est spécifique aux myotubes, que l'activité de Fyn est pratiquement exclusive à ceux-ci et que l'activité de Fyn est fortement inhibée par l'herbimycine A et le PP2 qui induisent fortement l'apoptose des myotubes, la tyrosine kinase Fyn pourraient jouer un rôle critique au niveau de la survie des myotubes.

2. Les kinases MAP p38 sont essentielles à l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src

Dans le deuxième volet de notre étude, nous avons porté notre intérêt au niveau des voies de signalisation importantes pour l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. La quête de cet objectif nous a permis de démontrer que l'activité des kinases MAP p38 est essentielle à l'apoptose des myotubes induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src. De plus, nous observons une activation soutenue des kinases MAP p38 dans les myotubes, s'étalant de 2,5 à 8 heures, lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src. Deux évidences permettent de corréler cette activation à l'apoptose des myotubes. Premièrement, aucune activation de p38 n'est observée dans les myoblastes où l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src n'affecte pas la survie. Deuxièmement, l'activation des kinases MAP p38 précède l'apparition de la dégradation internucléosomique de l'ADN qui est détectable après douze heures d'inhibition des tyrosines kinases Src. Il faut noter que

l'apoptose des myotubes n'est pas totalement bloquée par l'inhibition des kinases MAP p38. L'inhibition incomplète de l'apoptose peut résulter d'une faible activité résiduelle des kinases MAP p38 ou de la participation d'autres voies parallèles. Par exemple, il serait intéressant d'étudier le rôle potentiel des kinases MAP JNK, dont l'activation est souvent couplée à celle des kinases MAP p38 (Tibbles et Woodgett 1999), dans l'apoptose des myotubes. Les kinases MAP p38 ont également été associées à l'apoptose dans d'autres types cellulaires (Tibbles et Woodgett 1999). Dans la plupart de ces études, les événements responsables de l'activation des kinases MAP p38 sont peu élaborés. Toutefois, il a été rapporté que l'inhibition des protéines kinases C mène à l'activation des kinases MAP p38 et à l'apoptose dans certains types cellulaires (Ozaki et al., 1999 ; Jun et al., 1999). Cependant, il est peu probable que les PKCs agissent en aval des tyrosines kinases Src dans la promotion de la survie des myotubes. En effet, tel que mentionné précédemment, l'inhibition des protéines kinases C n'induit pas l'apoptose dans les cultures de cellules C2C12 différenciées. Suite à l'inhibition des tyrosines kinases Src, un délai assez important (2,5 heures) est observé avant l'activation des kinases MAP p38. Cependant, le délai réel demeure inconnu étant donné que le moment précis où apparaît l'inhibition des tyrosines kinases Src suite à l'addition de l'herbimycine A n'a pas été déterminé. Le temps nécessaire à la pénétration de l'herbimycine A dans le cytoplasme des myotubes pourrait expliquer ce délai. D'un autre côté, il est possible que l'activation des kinases MAP p38 survienne seulement une fois que l'inhibition des tyrosines kinases Src ait affecté l'homéostasie cellulaire ou même après le déclenchement du processus apoptotique. Une étude récente effectuée dans les cellules T98G, issues d'un gliome

humain, abonde en ce sens (Ozaki et al., 1999). Dans ces cellules, l'inhibition des PKCs induit une activation des kinases MAP p38 et l'apoptose. Ils observent un délai de deux heures avant l'activation des kinases MAP p38, ce qui est tout à fait comparable à ce que nous observons. Cette activation décalée des kinase MAP p38 est dépendante de l'activité de la caspase-3, elle survient donc suite à l'activation de l'apoptose. Finalement, leur étude a permis de démontrer que l'inhibition des kinases MAP p38 inhibe la dégradation internucléosomique de l'ADN sans toutefois altérer d'autres caractéristiques de l'apoptose tels le clivage de PARP (substrat des caspases) et la vacuolisation membranaire. De plus, l'inhibition des kinases MAP p38 ne permet pas aux cellules T98G de survivre. Ces résultats indiquent que l'apoptose n'est peut-être pas un processus aussi linéaire que ce qu'il était cru jusqu'à présent. Il serait important de vérifier la viabilité des myotubes C2C12 lors de l'inhibition simultanée des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38. L'isoforme de p38 spécifiquement impliquée dans l'apoptose des myotubes due à l'inhibition des tyrosines kinases Src demeure inconnue. Cependant, p38 γ est une candidate intéressante, puisqu'elle est exprimée presque exclusivement dans les myotubes (Cuenda et Cohen, 1999) et que l'apoptose due à l'inhibition des tyrosines kinases Src est spécifique à ceux-ci. Par contre, l'activité enzymatique de p38 γ n'est pas inhibée par le SB202190 (Goedert et al., 1997 ; Cuenda et al., 1997). Par conséquent, p38 γ ne serait pas la seule isoforme impliquée, puisque le SB202190 (inhibiteur de p38 α et p38 β (Young et al., 1997)) inhibe très efficacement l'apoptose des myotubes induite par l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. Il est probable que l'autre isoforme potentiellement impliquée dans l'apoptose des

myotubes induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src soit p38 α . En effet, cette dernière a été spécifiquement associée à l'apoptose, tandis que p38 β a été associée à la survie et à l'hypertrophie cellulaire (Nemoto et al., 1998 ; Wang et al., 1998). Cette situation est entre autre rencontré dans les myocytes cardiaques (Wang et al., 1998) qui font partie de la famille des muscles striés tout comme les fibres musculaires squelettiques.

3. L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src et des kinases MAP p38 affecte les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 Bcl-X_L et Bcl-2 ainsi que de la protéine anti-apoptotique Bag-1

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes régissant l'apoptose des myotubes, nous avons déterminé les niveaux d'expression relatifs de certains homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src, des kinases MAP p38 ou de ces deux voies à la fois. Par cette étude, nous avons constaté que lors de l'inhibition des tyrosine kinases Src, la balance entre pro- et anti-apoptotiques favorise les pro-apoptotiques, même si leur niveau d'expression n'est pas affecté (du moins dans le cas de Bad, Bak et Bax). En effet, les niveaux d'expression de Bcl-X_L et de la protéine anti-apoptotique Bag-1 chutent suite à l'inhibition des tyrosines kinases Src. Peu d'études mettent en lumière le lien qui existe entre l'activité des tyrosines kinases Src et l'expression des homologues Bcl-2. Cependant, il est connu que l'inhibition de p60^{c-Src} diminue l'expression de Bcl-X_L au

niveau transcriptionnel (Karni et al., 1999). L'inhibition des kinases MAP p38 ne cause aucune modulation des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques étudiés, mais amène une augmentation des niveaux d'expression de Bcl-2. Ceci suggère que les kinases MAP p38 pourraient moduler de façon négative l'expression de Bcl-2. La hausse de Bcl-2 est sans doute en partie responsable de l'atténuation de l'apoptose observée dans cette étude lors de l'inhibition des kinases MAP p38. Les baisses des niveaux d'expression de Bcl-X_L et de Bag-1 observées au cours de l'inhibition des tyrosines kinases Src ne sont pas corrigées par l'inhibition simultanée des kinases MAP p38. Donc, lors de l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src couplée à l'activation des kinases MAP p38, la balance est fortement affectée en faveur des pro-apoptotiques. Cependant, les tyrosines kinases de la famille Src et les kinases MAP p38 influencent de façon indépendante les niveaux d'expression des homologues Bcl-2.

4. L'activité des kinases MAP p38 est nécessaire à l'anoïkose des myotubes

L'anoïkose des fibres musculaires contribue à la progression de la MCMD. La compréhension des mécanismes sous-jacents à cette anoïkose est donc d'une grande importance. Par conséquent, nous avons évalué le rôle potentiel des kinases MAP p38 dans l'anoïkose des cellules C2C12 différenciées. Comme premier modèle d'anoïkose, nous avons utilisé l'anticorps P4C10 qui bloque le domaine extracellulaire des intégrines $\beta 1$ (Carter et al., 1990 ; Mould et al., 1997). Dans un

premier temps, nous avons montré que l'anticorps P4C10 induit l'anoïkose des cellules C2C12 différenciées. Cette anoïkose est presque totalement bloquée suite à l'inhibition des kinases MAP p38, donc l'activité des kinases MAP p38 joue un rôle important au niveau de l'anoïkose musculaire. Comme deuxième modèle d'anoïkose, nous avons utilisé les cellules de la lignée C2C12.B4/plam dont les myotubes entrent spontanément en anoïkose due à l'absence de mérosine et l'altération de l'expression des intégrines $\alpha 7\beta 1$ D. Encore une fois, l'activité des kinases MAP p38 s'est avérée essentielle à l'anoïkose dans ce contexte. Nous proposons donc que l'altération du lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine active les kinases MAP p38 qui jouent alors un rôle actif dans l'anoïkose musculaire. Dans cet optique, il est également possible que le lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine soit responsable de l'atténuation de l'activité des kinases MAP p38 et donc de la survie des myotubes. L'activation des kinases MAP p38 a également été observée dans d'autres modèles d'anoïkose (Khwaja et Downward, 1997) . Par contre, l'inhibition des kinases MAP p38 est sans effet sur l'anoïkose dans ces modèles (Khwaja et Downward, 1997).

5. L'activité de la tyrosine kinase Fyn chute lors de l'anoïkose des myotubes

Étant donné que la tyrosine kinase Fyn est importante pour la signalisation par les intégrines (Giancotti et Ruoslahti, 1999) et qu'elle pourrait jouer un rôle déterminant au niveau de la survie des myotubes, nous avons vérifié si la perte d'activité de Fyn pourrait être à la base de l'anoïkose des myotubes. En présence de

l'anticorps P4C10, nous observons une inhibition importante de l'activité de Fyn qui corrèle avec l'arrondissement et le détachement des cellules. Contrairement à l'activité, les niveaux d'expression de Fyn demeurent inchangés dans ces conditions. En absence de mérosine, la baisse d'activité de Fyn est comparable à celle observée en présence de l'anticorps P4C10. Une baisse d'expression de Fyn proportionnelle à la baisse d'activité est notée en absence de mérosine. Une situation analogue prévaut concernant les niveaux d'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ en absence de mérosine (Vachon et al., 1997). Dans ce cas, les niveaux d'ARNm ne sont pas affectés, ainsi il a été supposé que l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ est dégradée en absence de son ligand. À la lumière de ces informations, l'hypothèse que la tyrosine kinase Fyn soit partiellement dégradée en absence d'un des récepteur auquel elle est associée devient plausible. Donc, puisque 1) l'apoptose induite par l'inhibition des tyrosines kinases Src est spécifique aux myotubes tout comme l'anoïkose due à la perte du lien $\alpha 7\beta 1D$ -mérosine, 2) que l'activité de Fyn est pratiquement exclusive aux myotubes, 3) que l'activité de Fyn chute lors de l'altération du lien $\alpha 7\beta 1D$ -mérosine dans nos deux modèles d'anoïkose et 4) que les niveaux de Fyn et de l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ diminuent en absence de mérosine, nous suggérons que l'activité de Fyn est en partie dépendante du lien $\alpha 7\beta 1D$ -mérosine et que la baisse d'activité de Fyn suite à l'altération de ce lien contribue au déclenchement de l'anoïkose des myotubes. Le mode d'association potentiel de la tyrosine kinase Fyn et de l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ reste à être identifié. Cependant, nos résultats obtenus avec la cytochalasine D suggèrent que la survie des myotubes est indépendante de l'activité de la FAK. Par conséquent, il est peu probable que l'activation de Fyn par l'intégrine $\alpha 7\beta 1D$ implique la FAK.

Alternativement, Fyn peut être recrutée aux intégrines via la cavéoline-1 (Wary et al., 1996). Par contre, les fibres musculaires expriment uniquement la cavéoline-3 qui apparaît au cours de la différenciation myogénique (Galbiati et al., 1999). Or, il existe une corrélation intéressante entre l'apparition de la tyrosine kinase Fyn et de la cavéoline 3 au cours de la différenciation myogénique. Aucune association entre Fyn et la cavéoline-3 n'a été rapportée jusqu'à maintenant. Il en va de même concernant l'interaction entre la cavéoline-3 et la sous-unité $\alpha 7$. Cependant, l'investigation de ces interactions demeure d'un grand intérêt, puisqu'elles pourraient jouer un rôle critique dans la survie des myotubes.

6. L'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1 chute alors que celle du pro-apoptotique Bax augmente en absence de mérosine

Finalement, dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'anoïkose des myotubes dans le contexte de la MCMD, nous avons étudié les modulations des niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques en absence de mérosine. Cette étude nous a permis d'établir qu'en absence de mérosine la balance des niveaux d'expression relatifs penche clairement en faveur des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques. En effet, l'augmentation des niveaux d'expression du pro-apoptotique Bax est accompagnée d'une diminution des niveaux d'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1 chez les C2C12.B4/plam. On peut affirmer que la diminution des niveaux d'expression de

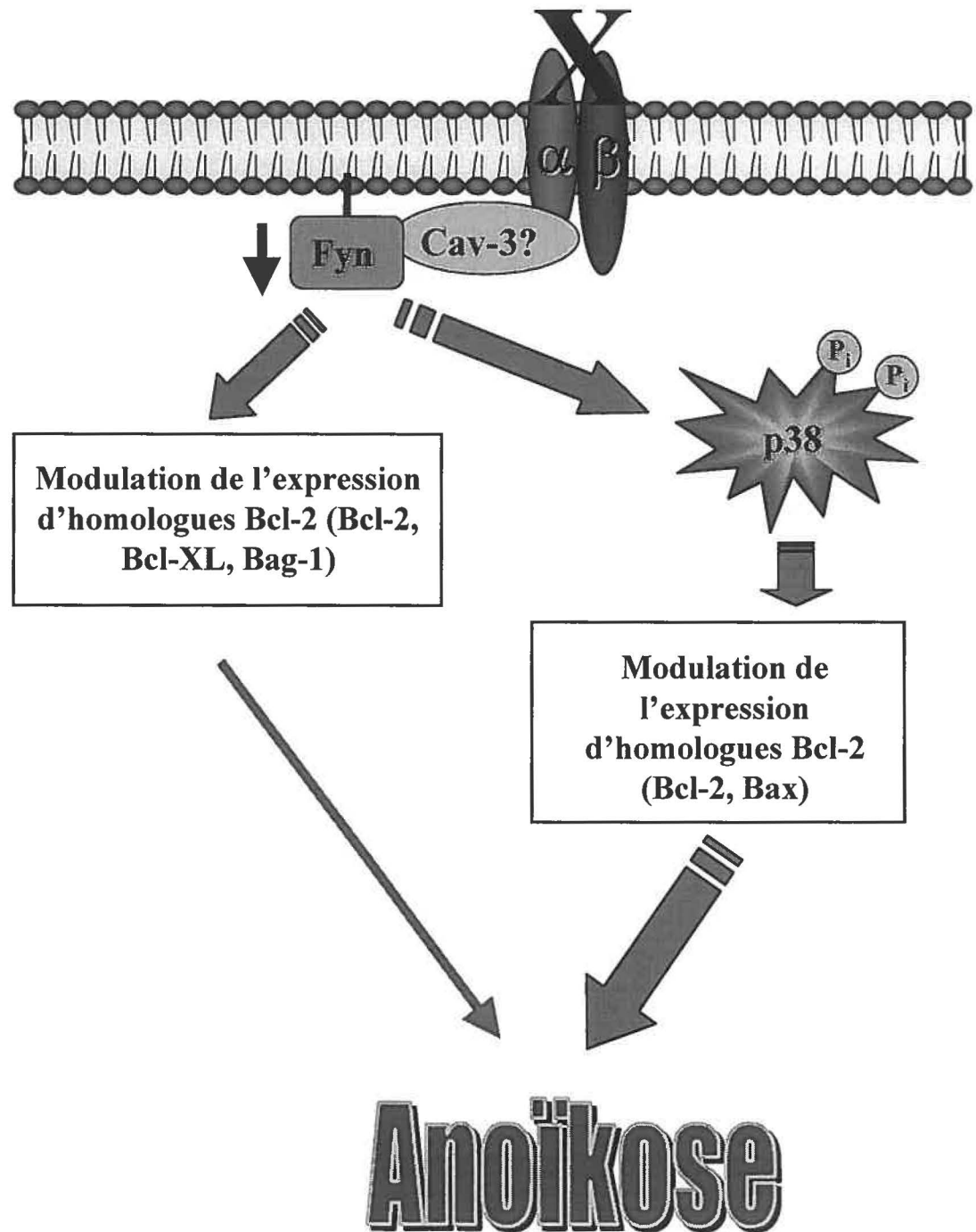
Bcl-X_L, Bcl-2 et Bag-1 sont spécifique à l'absence de mérosine, puisque leur niveau d'expression sont restaurés dans les C2C12.B4/pmer. Nous observons de plus une sur-expression de Bcl-2 chez les C2C12.B4/pmer. Cette surexpression de Bcl-2, également observée lors de l'inhibition des kinases MAP p38, pourrait compenser la légère hausse d'expression de Bak et Bax observée dans les C2C12.B4/pmer. La démonstration que la sur-expression de Bcl-2 peut inhiber l'anoïkose des C2C12.B4/plam a déjà été faite (Vachon et al., 1997). Il est possible d'établir certaines similarités en comparant les modulations des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 en absence de mérosine et lors de l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src. En effet, dans les deux cas, nous n'observons aucune modulation des niveaux d'expression des pro-apoptotiques Bad et Bak, alors que les niveaux d'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bag-1 chutent. Par contre, la baisse de Bcl-2 et l'augmentation de Bax, observées en absence de mérosine, n'ont pas lieu lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src. Suite à ces observations, il est possible que d'autres voies de signalisation, qui ne sont pas affectées lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src, sont inhibées et/ou activées lors de l'anoïkose des myotubes due à l'absence de mérosine. Alternativement, ces petites divergences seraient explicables par le fait que les C2C12.B4/plam et C2C12.B4/pmer utilisées ici constituent des clones. En effet, le processus de clonage peut engendrer des différences visibles vis à vis de la lignée parentale.

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de proposer un modèle d'anoïkose musculaire dans le contexte de la MCMD où l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-

mérosine induit une diminution de l'activité de Fyn et l'anoïkose des myotubes. Cette baisse d'activité de Fyn est également responsable, par un mécanisme qui demeure inconnu, de l'activation des kinases MAP p38 dont l'activité est essentielle à l'anoïkose des myotubes due à l'absence de mérosine. Ces événements précoces sont intégrés par les homologues Bcl-2 dont les niveaux d'expression de certains membres sont modulés en absence de mérosine, favorisant ainsi les pro-apoptotiques (Fig. 21).

Figure 21. Modèle proposé. Dans l'ensemble, nos résultats permettent de proposer un modèle d'anoïkose musculaire dans le contexte de la MCMD où l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1D$ -mérosine induit une diminution de l'activité de Fyn et l'anoïkose des myotubes. Cette baisse d'activité de Fyn est également responsable, par un mécanisme qui demeure inconnu, de l'activation des kinases MAP p38 dont l'activité est essentielle à l'anoïkose des myotubes due à l'absence de mérosine. Ces événements précoces sont intégrés par les homologues Bcl-2 dont les niveaux d'expression de certains membres sont modulés en absence de mérosine, favorisant ainsi les pro-apoptotiques. Le recrutement de Fyn pourrait se faire via la cavéoline-3 .

Abréviations : Cav-3 = cavéoline-3, Pi = Phosphate, α = sous-unité $\alpha 7$, β = sous-unité $\beta 1D$.



V-CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude est la première à identifier une voie de signalisation essentielle à la survie des myotubes, soit les tyrosines kinases de la famille Src. La survie des myoblastes à sous-confluence est indépendante de cette famille de kinases. Donc, à l'instar des composantes de la matrice extracellulaire, la survie des myoblastes et des myotubes dépend de voies de signalisation différentes. Notre étude montre également pour la première fois une voie de signalisation nécessaire à l'apoptose des myotubes, soit les kinases MAP p38. Nous avons également approfondi le rôle de ces voies de signalisation au niveau de la régulation de l'apoptose en étudiant les modulations des niveaux d'expression de certains homologues Bcl-2 et de la protéine anti-apoptotique Bag-1. Lors de l'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src, la baisse d'expression de Bcl-X_L et de Bag-1 fait pencher la balance en faveur des pro-apoptotiques. D'autre part, lors de l'inhibition des kinases MAP p38, la hausse de Bcl-2 explique, du moins en partie, l'inhibition de l'apoptose. Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons répondu plus spécifiquement à nos objectifs en montrant que les tyrosines kinases Src (Fyn) et les kinases MAP p38 possédaient également un rôle important au niveau de l'anoïkose due à l'altération de la liaison $\alpha 7 \beta 1$ D-mérosine. En effet, nous avons montré une corrélation évidente entre la liaison $\alpha 7 \beta 1$ D-mérosine, l'activité de Fyn et la survie des myotubes. De plus, nous avons montré que l'anoïkose due à l'altération du lien $\alpha 7 \beta 1$ D-mérosine requiert l'activité des kinases MAP p38. Cette observation, en plus de donner des information concernant l'anoïkose des myotubes, nous en apprend sur

les mécanismes de l'anoïkose de façon générale. En effet, nous sommes les premiers à démontrer clairement un rôle des kinases MAP p38 dans l'anoïkose. La modulation des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 est plus complexe en absence de mérosine que lors de l'inhibition des tyrosines kinases Src, puisque nous observons une baisse d'expression de Bcl-2, de Bcl-X_L et de Bag-1 couplée à une hausse d'expression de Bax. Ceci implique la possibilité que des voies de signalisation indépendantes des tyrosines kinases Src, qui reste à être identifiées, sont inhibées et/ou activées lors de l'altération du lien $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine. Nous avons donc élucidé en partie les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'anoïkose des myotubes dans le contexte de la MCMD. De ces observations, nous proposons que les tyrosines kinases de la famille Src pourraient jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité du muscle squelettique, tandis que les kinases MAP p38 pourraient être impliquées dans la progression de la dystrophie musculaire congénitale à déficience en mérosine. Dans l'avenir, il sera important de consolider le rôle de Fyn dans l'anoïkose due à l'absence de mérosine. Ceci pourrait être fait par transfection d'un mutant constitutivement actif dans nos modèle d'anoïkose. Alternativement, nous pourrions transfecter un dominant négatif et analyser son effet dans des myotubes adhérents. Il serait également intéressant d'étudier le rôle potentiel de la tyrosine kinase Yes, puisque ses fonctions entrecoupent souvent celles de Fyn. À long terme, il serait primordial d'identifier avec précision quelle isoforme de p38 est impliquée dans l'anoïkose musculaire par transfection de dominant négatif ou par expression d'ARNm anti-sens. Il serait également intéressant d'identifier avec précision les événements en aval des tyrosines kinases Src responsables de la survie des myotubes

et quelles sont les autres voies de signalisation activées et/ou inhibées lors de l'anoïkose due à l'absence de mérosine. Il serait également intéressant d'étudier l'expression d'autres homologues Bcl-2 en absence de mérosine et d'identifier les caspases impliquées dans l'anoïkose due à l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine. Finalement, il serait primordial d'élucider les mécanismes qui relient les tyrosines kinases Src aux kinases MAP p38. Entre autre, il faudrait vérifier si l'activation des kinases MAP p38 se trouve en amont ou aval des caspases. Le but de décortiquer avec soin tous les joueurs et les étapes impliqués est d'identifier une étape spécifique à l'anoïkose des myotubes due à l'altération de la liaison $\alpha 7\beta 1$ D-mérosine. Nous pourrions ainsi espérer mettre au point un médicament, susceptible d'inhiber l'anoïkose musculaire dans la MCMD, qui serait à tout le moins palliatif pour les dystrophies musculaires congénitales à déficience en mérosine.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Pierre H. Vachon pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler sur un projet aussi passionnant. Je remercie également les Drs E. Engvall et J.C. Reed pour nous avoir fourni des outils essentiels à notre étude. Un merci tout particulier à Anne Vézina pour son aide technique et son encouragement. Merci également au Dr Nathalie Rivard pour ses précieux conseils et pour m'avoir permis d'effectuer certaines expériences dans son laboratoire. Je tiens également à remercier Ève-Marie Poirier pour son aide au cours de l'été 1999. Je salut également mes compères de travail Éric Cardin, Rémi Gauthier et Charlène Harnois avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir au cours de ces deux années. Finalement, j'exprime toute ma gratitude envers tous les membres de ma famille, en particulier mon épouse Mylène, pour leur patience et leur soutien depuis le tout début de mes études universitaires.

BIBLIOGRAPHIE

Aagaard-Tillery K.M. et Jelinek D.F. 1994. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. *Cell. Immunol.* 156 : 493-507.

Adams J.C. et Watt F.M. 1993. Regulation of the development and differentiation by the extracellular matrix. *Development.* 117 : 1183-1198.

Adams J.M. et Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science.* 281 : 1322-1326.

Al-Ramadi B.K., Zhang H. Et Bothwell A.L.M. 1998. Cell-cycle arrest and apoptosis hypersusceptibility as a consequence of Lck deficiency in non-transformed T lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 : 12498-12503.

Ashkenasi A. et Dixit V.M. 1998. Death receptors : signaling and modulation. *Science* 281 : 1305-1308.

Bao Z.Z., Lakonishock M., Kaufman S. et Horwitz A.F. 1993. $\alpha 7\beta 1$ integrin is a component of the myotendinous junction on skeletal muscle. *J.Cell Sci.* 106 : 579-589.

Basora N., Vachon P.H., Herring-Gillam F.E., Perreault N. et Beaulieu J.F. 1997. Relation between integrin $\alpha 7\beta 1$ expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology.* 113 : 1510-1521.

Belkin A.M., Zhidkova N.I., Balzac F., Altruda F., Tomatis D., Maier A., Tarone G., Koteliensky V.E. et Burridge K. 1996. $\beta 1D$ integrin displace the $\beta 1A$ isoform in striated muscles : Localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* 132 : 211-226.

Berra E., Diaz-Meco M.T. et Moscat J. 1998. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of ERK is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 273 : 10792-10797.

Bissonette N. et Hunting D.J. 1998. p21-induced cycle arrest in G_1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 16 : 3461-3469.

Blau H.M., Pavlath G.K., Hardeman E.C., Chiu C.P., Silberstein L., Webster S.G., Miller S.C. et Webster Cecelia. 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science.* 230 : 758-766.

Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G. et Thompson C.B. 1993. Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74 : 597-608.

Bolen J.B. et Brugge J.S. 1997. Leucocyte protein tyrosine kinases : potential targets for drug discovery. *Annu. Rev. Immunol.* 15 : 371-404.

Börsch A.G., Pasquet S. et Watson S.P. 1998. Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitor SB 203580 and PD 98059. *J. Biol. Chem.* 273 : 28766-28772.

Boudreau N., Sympson C.J., Werb Z. et Bissell M.J. 1995. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*. 267 : 891-893.

Bronner-Fraser M., Artinger M., Muschler J. et Hortschitz A.F. 1992. Developmentally regulated expression of $\alpha 6$ integrin in avian embryos. *Development (Camb.)*. 115 : 197-211.

Brown M.T. et Cooper J.A. 1996. Regulation, substrates and function of Src. *Biochem. Biophys. Acta*. 1287 : 121-149.

Burridge K. et Chrzanowska-Wodnicka M. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 : 463-518.

Brugge J.S. et Erikson R.L. 1977. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*. 269 : 269-346.

Burkin D.J. et Kaufman S. 1999. The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res*. 296 : 183-190.

Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G. et Turner C. 1988. Focal adhesions : transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 : 487-525.

Campbell K.P. 1995. Three muscular dystrophies : loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 80 : 675-679.

Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesson G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. et Reed J.C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 282 : 1318-1321.

Cardone M.H., Salvesen G.S., Widmann C., Johnson G. et Frisch S.M. 1997. The regulation of anoikis : MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*. 90 : 315-323.

Carter W.G., Wayner E.A. Bouchard T.S. et Kaur P. 1990. The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* 110 : 1387-1404.

Castellani L., Reedy M.C., Gauzzi M.C., Provenzano C., Alemà S. et Falcone G. 1995. Maintenance of the differentiated state in skeletal muscle : Activation of v-Src disrupts sarcomeres in quail myotubes. *J. Cell Biol.* 130 : 871-885.

Castellani L., Reedy M.C., Airey J.A., Gallo R., Ciotti M.T., falcone G. et Alemà S. 1996. remodeling of cytoskeleton and triads following activation of v-Src tyrosine kinase in quail myotubes. *J. Cell Sci.* 109 : 1335-1346.

Chen H.C., Appeddu P.A., Isoda H. Et Guan J.L. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271 : 26329-26334.

Chen Y.H., Pouyssegur J., Courtneige S.A. et Obberghen-Schilling E.V. 1994. Activation of Src family kinase activity by the G protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblast. *J. Biol. Chem.* 269 (44) : 27372-27377.

Cheng E.H.-Y., Kirsh D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., Ueno K. et Hardwick J.M. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax like death effector by caspases. *Science* 278 : 1966-1968.

Clark E.A. et Brugge J.S. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268 :233-239.

Clifton A.D., Young P.R. et Cohen P. 1996. A compaison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS lett.* 392 : 209-214.

Collet M.S. et Erikson R.L. 1978. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75 : 2021-2024.

Cooper J.A., Gould K.L., Cartwright C.A. et Hunter T. 1986. Tyr 527 is phosphorylated in pp60^{c-Src} : implications for regulation. *Science.* 231 : 1431-1434.

Conforti G., Zanetti A., Pasquali-Ronchetti I., Quaglino D.Jr, Neyroz P. et Dejana E. 1990. Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition. *J. Biol. Chem.* 265 : 4011-4019.

Cory S. 1995. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu. Rev. Immunol.* 13 : 513-543.

Coso O.A., Chiariello M., Yu J.C., Teramoto H., Crespo P. et Xu N. 1995. The small GTP-binding protein Rac and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 81 : 1137-1146.

Crawley J.B., Rawlinson L., Lali F.V., Page T.H., Saklatvala J. et Foxwell B.M. 1997. T cell proliferation in response to interleukin 2 and 7 requires p38 MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.* 272 : 15023-15027.

Cuenda A. et Cohen P. 1999. Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J. Biol. Chem.* 274 : 4341-4346.

Cuenda A., Cohen P., Buée-Scherrer V. and Goedert M. 1997. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 16 : 295-305.

Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. et Greenberg M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91 : 231-241.

Dedhar S. 2000. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 : 250-256.

De Melker A.A. et Sonnerberg A. 1999. Integrins : alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *BioEssays*. 21 : 499-509.

Duband J.L., Belkin A.M., Syfrig J., Thiery J.P. et Kotliansky V.E. 1992. Expression of the $\alpha 1$ integrin, a laminin-collagen receptor, during myogenesis and neurogenesis in the avian embryo. *Development* 116 : 585-600.

Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J. et Saitiel A.R. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92 : 7686-7689.

Ellis R.E., Yuan J. et Horvitz H.R. 1991. Mechanisms and function of cell death. *Anu. Rev. Cell Biol.* 4 : 663-698.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. et Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature* 391 : 43-50.

Engvall E. 1993. Laminins variants : why, where, and when? 1993. *Kidney Int.* 43 : 2-6.

- Engvall E., Earwicker D., Haaparanta T., Ruoslahti E. Et Sanes J.R. 1990. Distribution and isolation of four laminin variants ; tissue-restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul.* 1 : 731-740.
- Engvall E. et Wewre U.M. 1996. Domains of laminin. *J. Cell Biochem.* 61 : 493-501.
- Enomoto M.I., Boettinger D. et Menko A.S. 1993. $\alpha 5$ integrin is a critical component of adhesion plaques in myogenesis. *Dev. Biol.* 155 : 180-197.
- Fallon R.J., Danaher M., Saylors R.L. et Saxena A. 1994. Defective asialoglycoprotein receptor endocytosis mediated by tyrosine kinase inhibitors. Requirement for a tyrosine in the receptor internalization signal. *J. Biol. Chem.* 269 : 11011-11017.
- Franklin C.C. Srikanth S. et Kraft A.S. 1998. Conditionnal expression of mitogen activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective againsts UV-induced apoptosis. *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA.* 95 : 3014-3019.
- Frisch S.M. 1999. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr. Biol.* 9 : 1047-1049.
- Frisch S.M. et Francis H. 1994. Disruption of epithelial cell matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124 : 619-626.
- Frisch S.M. et Ruoslahti E. 1997. Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 701-706.
- Frisch S.M., Vuori K., Kelaita D. et Sicks S. 1996. A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis ; suppression by Bcl-2 and crmA. *J. Cell Biol.* 135 : 1377-1382.
- Frisch S.M., Vuori K., Ruoslahti E. et Chan-Hui P.Y. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* 134 : 793-799.
- Fujio Y., Guo K., Mano T., Mitsuuchi Y., Testa J.R. et Walsh K. 1999. Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 5073-5082.
- Fujita N., Nagahashi A., Nagashima K., Rokudai S. Et Tsuru T. 1998. Acceleration of apoptotic cell death after the clivage of Bcl-X_L protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 17 : 1295-1304.
- Fukui Y. et Hanafusa H. 1991. Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase modification for its association with p60^{c-Src}. *Mol. Cell Biol.* 11 : 1972-1979.

Futaki N., Takahashi S., Yokoyama M., Arai I., Higuchi S. et Otomo S. 1994. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. Prostaglandins. 47 : 55-59.

Gabai V.L., Merlin A.B., Mosser D.D., caron A.W., Rits S. et Shifrin V.I. 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. J. Biol. Chem. 272 : 18033-18037.

Galbiati F., Volonté D., Engelman J.A., Scherer P.E. et Lisanti M.P. 1999. Targeted down regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. J. Biol. Chem. 274 : 30315-30321.

Giancotti F.G. et Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. Science. 285 : 1028-1032.

Glucksman A. 1951. Cell death in the normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. 26 : 59-86.

Goedert M., Cuenda A., Craxton M., Jakes R. et Cohen P. 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. EMBO J. 16 : 3563-3571.

Guay J., Lambert H., Gingras-Breton G., lavoie J.N., Huot J. et Landry J. 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. J. Cell Sci. 110 : 357-368.

Gullberg D., Tiger C.F. et Velling T. 1999. Laminins during muscle development and in muscular dystrophies. Cell Mol. Life Sci. 56 : 442-460.

Haldar S., Jena N. et Croce C.M. 1995. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 4507-4511.

Hall-Jackson C.A., Goedert M., Hedge P. et Cohen P. Effect of SB 203580 on the activity of c-Raf *in vitro* and *in vivo*. Oncogene. 18 : 2047-2054.

Han J., Lee J.D., Bibbs L. et Ulvitch R.J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science. 265 : 808-811.

Hase H., Hirayama E. et Kim J. 1996. Further investigation of some inhibitors on myogenic differentiation : mechanism of inhibition with HMBA on quail myoblasts transformed with Rous sarcoma virus. Cell Struct. Funct. 21 : 17-25.

Hayashi Y.K., Chou F.L., Engvall E., Ogawa M., Matsuda C., Hirabayashi S., Yokochi K., Ziober B.L., Kramer R.H., Kaufman S.J., Ozawa E., Goto Y-I., Nonaka I., Tsukahara T., wang J.Z., Hoffman E.P. et Arahata K. 1998. Mutations in the integrin $\alpha 7$ gene cause congenital myopathy. Nature gen. 19 : 94-97.

Hazzalin C.A., Cano E., Cuenda A., Barratt M.J., Cohen P et Mahadevan L.C. 1996. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses : JNK/SAPK and c-jun ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr. Biol.* 6 : 1028-1031.

Heikkilä J., Jalava A. et Eriksson K. 1993. The selective protein kinase C inhibitor GF109203X inhibits phorbol ester-induced morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197 : 1185-1193.

Helbing-Leclerc A., Zhang X. Topaloglu H., Cruaud C., Tesson F., Weissenbach J., Tomé F.M., Schartz K., Fardeau M., Tryggvason K. et Guicheney P. 1995. Mutations in the $\alpha 2$ -chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 11 : 216-218.

Hirsch D.D. et Stork P.J. 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathway *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 272 : 4568-4575.

Hirst R., Horvitz A., Buck C. et Rohrschneider L. 1986. Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 6470-6474.

Hodges B.L. et Kaufman S.J. 1996. Developmental regulation and function significance of alternative splicing of NCAM and $\alpha 7\beta 1$ integrin in skeletal muscle. *Basic Appl. Myol.* 6 : 437-446.

Hosoi H., Dilling M.B., Shokata T., Liu L.N., Shu L., Ashmun R.A., Germain G.S., Abraham R.T. et Houghton P.J. 1999. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* 59 : 886-894.

Hu Y., Benedict M.A., Wu D., Inohara N. et Nuñez G. 1998. Bcl-X_L inhibits APAF-1-dependent caspase-9 activation.

Hynes R.O. 1992. Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69 : 11-25.

Ibraghimov-Beskrovnaia O., Ervasti J.M., Leveille C.J., Slaughter C.A., Sernett S.W. et Campbell K.P. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to extracellular matrix. *Nature* 355 : 696-702.

Ichijo H., Nishida E., Irie K., Dijke P., Saitoh M. et Moriguchi T. 1997. Induction of apoptosis by ASK-1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 275 : 90-94.

- Ilic D., Almeida E.A., Schlaepfer D.D., Dazin P., Aisawa S. et Damsky C.H. 1998. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J. Cell Biol.* 143 : 547-560.
- Janknecht R. et Hunter T. 1997. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* 16 : 1620-1627.
- Jia L., Macey M.G., Yin Y., Newland A.C. et Kesley S.M. 1999. Subcellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis. *Blood* 93 : 2353-2359.
- Jun C.D., Oh C.D., Kwak H.J., Pae H.O., Yoo J.C., Choi B.M., Chun J.S., Park R.K. et Chung H.T. 1999. Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis : Involvement of c-Jun N-Terminal kinase/Stress activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J. Immunol.* 162 : 3395-3401.
- Kalmes A., Deou J., Clowes A.W. et Daum G. 1999. Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB 203580. *FEBS Lett.* 444 : 71-74.
- Kaplan K.B., Bibbins K.B., Swedlow J.L., Arnaud M., Morgan D.O. et Varmus H.E. 1994. Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesion alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *EMBO J.* 13 : 4745-4756.
- Karni R., Jove R. et Levitzki A. 1999. Inhibition of pp60^{c-Src} reduces expression of Bcl-X_L and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene.* 18 : 4654-4662.
- Katagiri K., Yokoyama K.K., Yamamoto T., Omura S., Irie S. Et Katagiri T. 1996. Lyn and Fgr protein-tyrosine kinases prevent apoptosis during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 271 : 11557-11562.
- Kawasaki H., Morooka T., Shimohama S., Kimura J., Hirano T. et Gotoh Y. 1997. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 272 : 18518-18521.
- Keely P.J. et Parise L.V. 1996. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J. Biol. Chem.* 271 : 26668-26676.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. et Currie A.R. 1972. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 : 239-257.

Khwaja A. et Downward J. 1997. Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139 : 1017-1023.

Khwaja A., Rodriguez-Viciana P., Wennstrom S., Warne P. et Downward J. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J.* 16 : 2783-2793.

Kim J., Adachi T., Hirayama E., Yabubayashi T. et Okada Y. 1992. Differentiation of quail myoblasts transformed with a temperature sensitive mutant of Rous sarcoma virus. I. Relationship between differentiation and tyrosine kinase of src gene product. *Cell Struct. Funct.* 17 : 237-247.

Kim Y.B., Zhu J.S., Zierath J.R., Shen H.Q., Baron A.D. et Kahn B.B. 1999. Glucosamine infusion in rats rapidly impairs insulin stimulation of phosphoinositide but does not alter activation of Akt/protein kinase B in skeletal muscle. *Diabetes.* 48 : 310-320.

Kirchhofer D., Languino L.R., Ruoslahti E. et Pirschbacher M.D. 1990 a. $\alpha 2\beta 1$ integrins from different cell types show different binding specificities. *J. Biol. Chem.* 265 : 615-618.

Kirchhofer D., Ruoslahti E., Grzesiak J. et Pirschbacher M.D. 1990 b. Cation-dependant changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J. Biol. Chem.* 265 : 18525-18530.

Koseki T., Inohara N., Chen S. et Nunez G. 1998. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 : 5156-5160.

Krajewski S., Bodrug S., Gascoyne R., Berean K., Krajewska M. et Reed J.C. 1994a. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am. J. Pathol.* 145 : 515-525.

Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Miyashita T., Wang H.G. et Reed J.C. 1994b. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.* 145 : 1323-1336.

Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W. Et Reed J.C. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein : residence in nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53 : 4701-4714.

Krestow J.K., Rak J., Filmus J. et Kerbel R.S. 1999. Functional dissociation of anoikis-like cell death and activity of stress activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 : 48-53.

Kroll T.G., Peters B.P., Marziasz Hustad C., Jones P.A., Killen P.D. et Rudden R.W. 1994. Expression of laminin chains during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 269 : 9270-9277.

Kuang W., Xu H., Vachon P.H. et Engvall E. 1998. Disruption of the *lama2* gene in embryonic stem cells : laminin $\alpha 2$ is necessary for sustenance of mature muscle cells. *Exp. Cell Res.* 241 : 117-125.

Kuang W., Xu H., Vilquin J.T. et Engvall E. 1999. Activation of the *lama2* gene in muscle regeneration : abortive regeneration in laminin $\alpha 2$ -deficiency. *Lab. Invest.* 79 : 1601-1613.

Kühl U., Ocalan M., Timpl R. et von der Mark K. 1982. Role of laminin and fibronectin in selecting myogenic versus fibrogenic cells from skeletal muscle cells *in vitro*. *Dev. Biol.* 117 : 628-635.

Kumar C.C. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene.* 17 : 1365-1373.

Kurowski T.G., Lin Y., Luo Z., Tschlis P.N., Buse M.G., Heydrick S.J. et Ruderman N.B. 1999. Hyperglycemia inhibits insulin activation of Akt/protein kinase B but not phosphatidylinositol 3-kinase in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 48 : 658-663.

Lee J., Wang Z.Y., Luoh S.M., Wood W.I. et Scaden D.T. 1994. Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase encoding gene. *Gene.* 138 : 247-251.

Li H., Zhu H., Xu C.J. et Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94 : 491-501.

Lipfert L., Haimovitch B., Schaller M.D., Cobb B.S., Parson J.T. et Brugge J.S. 1992. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J. Cell Biol.* 119 : 905-912.

Luttrell D.K., Luttrell L.M. et Parson S.J. 1988. Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress p60^{c-Src}. *Mol. Cell Biol.* 8 : 497-501.

Maglara A., Jackson M.J. et McArdle A. 1998. Programmed cell death in skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 26 : S259.

Marieb E.N. 1993. Anatomie et physiologie humaine. ERPI. p. 249.

Martin P.T., Kaufman S.J., Kramer R.H. et Sanes J.R. 1996. Synaptic integrins : selective association of the $\alpha 1$ and $\alpha 7A$, and $\alpha 7B$ subunits with de neuromuscular junction. *Dev. Biol.* 174 : 125-139.

- Matsuda S., Moriguchi T., Koyasu S. et Nishida F. 1998. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporine A. *J. Biol. Chem.* 273 : 12378-12382.
- May W.S., Tyler P.G., Ito T., Armstrong D.K., Qatsha K.A. et Davidson N.E. 1994. Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of Bcl-2 α in association with suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 269 : 26865-26870.
- Mayer B.J. et Baltimore D. 1993. Signaling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol.* 3 : 8-13.
- Mayer U., Nischt R., Pöschl E., Mann K., Fukuda K., Gerl M., Yamada Y. et Timpl R. 1993. A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J.* 12 : 1879-1885.
- Mayer U., Saher G., Fässler R., Bornemann A., Echtermeyer F., von der Mark h., Miosge N., Pöschl E. et von der Mark K. 1997. Absence of integrin α 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nature Gen.* 17 : 318-323.
- McDonald K.A., Lakonishock M. et Horwitz A.F. 1995. α 3 and α v in myofibrillogenesis. *J. Cell Sci.* 108 : 2573-2581.
- Mecham R.P. 1991. Receptors for laminin on mammalian cells. *FASEB J.* 5 : 2538-2546.
- Meredith J.E., Fazeli B. et Schwartz M.A. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 953-961.
- Mould A.P., Askari J.A., Aota S.I., Yamada K.M., Irie A., Takada Y., mardon H.J. et Humphries M.J. 1997. Defining the topology of integrin α 5 β 1-fibronectin interactions using inhibitory anti- α 5 and anti- β 1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergic sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the α 5 subunit. *J. Biol. Chem.* 272 : 17283-17292.
- Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L. Ng S.L. et Fesik S.W. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-X_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381 : 335-341.
- Mukasa T., Momoi T. et Momoi M.Y. 1999. Activation of caspase-3 apoptotic pathway in skeletal muscle fibers in laminin α 2-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 : 139-142.

Nemoto S., Xiang J., Huang S. et al. 1998. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 β mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273 : 16415-16420.

Oberg-Welsh C. et Welsh M. 1995. Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution. *Gene.* 152 : 239-242.

Ohmichi M., Decker S.J., Pang L. et al. 1992. Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the activity of the trk tyrosine kinase. *Biochemistry.* 31 : 4034-4039.

Oltvai Z., Millmann C. et Korsmeyer S.J., 1993. Bcl-2 heterodimerize *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates death. *Cell* 74 : 491-501.

Ozaki I., Tani E., Ikemoto H., Kitagawa H. et al. 1999. Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 kinase in calphostin C-induced apoptosis requires caspase-3-like proteases but is dispensable for cell death. *J. Biol. Chem.* 274 : 5310-5317.

Park D.J., Min H.K. et Rhee S.G. 1991. IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 266 : 24237-24240.

Parsons J.T. et Parsons S.J. 1997. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 187-192.

Patton B.L., Miner J.H., Chiu A.Y. et al. 1997. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing adult and mutant mice. *J. Cell Biol.* 139 : 1507-1521.

Patton B.L., Chiu A.Y. et al. 1998. Synaptic laminin prevents glial entry into synaptic cleft. *Nature* 393 : 698-701.

Peterson G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83 : 346-356.

Pozzi A., Wary K.K., Giancotti F.G. et al. 1998. Integrin $\alpha 1 \beta 1$ mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway *in vivo*. *J. Cell Biol.* 142 : 587-594.

Price M.A., Cruzalegui F.H. et al. 1996. The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate ternary complex factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* 15 : 6552-6563.

Puthalakath H., Huang D.C.S., O'Reilly L.A., King S.M. et al. 1999. The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with dynein motor complex. *Mol. Cell* 3 : 287-296.

- Qin S., Ding J., Kurosaki T. et Yamamura H. 1998. A deficiency in Syk enhances ceramide-induced apoptosis in DT40 lymphoma cells. *FEBS letters* 427 : 139-143.
- Rammel C., Clarke B.A., Zimmermann S., Nuñez L., Rossman R., Reid K., Moelling K., Yancopoulos G.D. et Glass D.J. 1999. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*. 286 : 1738-1742.
- Richardson A. et Parson J.T. 1996. A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Nature*. 380 : 538-540.
- Robbins S.M., Quintrell N.A. et Bishop J.M. 1995. Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell Biol.* 15 : 3507-3515.
- Robinson M.J. et Cobb M.H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 180-186.
- Rodriguez-Fernandez J.L. et Rozengurt E. 1996. Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol ester rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271 : 27895-27901.
- Rosekelly C.D., Desprez P.Y. et Bissel M.J. 1995. A hierarchy of ECM-mediated signaling regulates tissue-specific gene expression. *Cur. Opin. Cell Biol.* 7 : 736-747.
- Roulston A., Reinhard C., Amiri P. et Williams L.T. 1998. Early activation of c-Jun N-terminal and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 273 : 10232-10239.
- Rytömaa M., Martins L.M. et Downward J. 1999. Involvement of FADD and caspase-8 signaling in detachment-induced apoptosis. *Curr. Biol.* 9 : 1043-1046.
- Saini K.S. et Walker N.I. 1998. Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 178 : 9-25.
- Sanes J.R., Schachner M. et Couvalt J. 1986. Expression of several adhesive molecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult and denervated adult skeletal muscles. *J. Cell Biol.* 102 : 420-431.
- Saunders J.W. 1966. Death in embryonic systems. *Science* 154 : 604-12.
- Schaller M.D., Hildebrand J.D., Shannon J.D., Fox J.W., Vines R.R. et Parson J.T. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell Biol.* 14 : 1680-1688.

Schlaepfer D., Hanks S., Hunter T. et van de Geer P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 372 : 786-791.

Schlaepfer D., Broome M.A. et Hunter T. 1997. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol. Cell Biol.* 17 : 1702-1713.

Schlaepfer D. et Hunter T. 1998. Integrin signaling and tyrosine phosphorylation : just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8 : 151-157.

Schuler F. Et Sorokin L.M. 1995. Expression of laminin isoforms in mouse myogenic cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 108 : 3795-3805.

Shi Z.Q., Lu W. et Feng G.S. 1998. The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273 : 4904-4908.

Sicheri F., Moarefi I. et Kuriyan J. 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature*. 385 : 602-609.

Solhonne B., Lenormand J.L., Pospel K., Leibovitch M.P. et Leibovitch S.A. 1999. MyoD binds to Mos and inhibits the Mos/MAP kinase pathway. *FEBS Letters*. 461 : 107-110.

Somwar R., Sumitani S., Taha C., Sweeney G. Et Klip A. 1998. Temporal activation of p70 S6 kinase and Akt1 by insulin : PI 3-kinase-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275 : E618-625.

Song W.K., Wang W., Sato H., Bielser D.A. et Kaufman S.J. 1993. Expression of $\alpha 7$ integrin cytoplasmic domains during skeletal muscle development : alternate forms, conformational change, and homologies with serine/threonine kinases and tyrosine phosphatases. *J. Cell Sci.* 106 : 1139-1152.

Sorokin L.M., Pausch F., Frieser M., Kroger S., Ohage F. Et Deutzmann R. 1997. Developmental regulation of the laminin $\alpha 5$ chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev. Biol.* 189 : 285-300.

Stein B., Brady H., Yang M.X., Young D.B. et Barbosa M.S. 1996. Cloning and characterization of MEK-6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 271 : 11427-11433.

Stempka L., Girod A., Müller H.J., Rincke G., Marks F., Gschwendt M. et Bossmeyer D. 1997. Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *J. Biol. Chem.* 272 : 6805-6811.

Sunada Y., Bernier S.M., Kozak C.A., Yamada Y. et Campbell K.P. 1994. Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *J. Biol. Chem.* 269 : 13729-13732.

Sutherland A., Calarco P.G., Damsky C.H. 1993. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119 : 1175-1186.

Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C. et Croce C.M. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226 : 1097-1099.

Takahashi A., Alnemri E.S., Lazebnik Y.A., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Moir R.D., Goldman R.D., Poirier G.G., Kaufmann S.H. et Earnshaw W.C. 1996. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 : 8395-8400.

Takayama S., Sato T., Krajewski S., Kochel K., Irie S., Millan J.A. et Reed J.C. 1995. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*. 80 : 279-284.

Tanaka S., Saito K. et Reed J.C. 1993. Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 β protein restore function as a regulator of cell survival. *J. Biol. Chem.* 268 : 10920-10926.

Tibbles L.A., Ing Y.L., Kiefer F., Chan J., Iscove N. et Woodgett J.R. 1996. MLK-3 activates the SAPK JNK pathways via SEK-1 and MKK3/6. *EMBO J.* 15 : 7026-7035.

Tibbles L.A. et Woodgett J.R. 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol. Life Sci.* 55 : 1230-1254.

Thomas M.T. et Brugge J.S. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 : 513-609.

Thornberry N.A. et Lazebnik Y. 1998. Caspases : ennemies within. *Science*. 281 : 1312-1316.

Tsao C-Y. et Mendell J.R. 1999. The childhood muscular dystrophies : making order out of chaos. *Semin. Neurol.* 19 : 9-23.

- Uren A.G., Coulson E.J. et Vaux D.L. 1998. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem.* 23 : 159-162.
- Vachon P.H., Loechel F., Xu H., Wewer U.M. et Engvall E. 1996. Merosin and laminin in myogenesis ; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J. Cell Biol.* 134 : 1483-1497.
- Vachon P.H., Xu H., Liu L., Loechel F., Hayashi Y., Arahata K., Reed J.C., Wewer U.M. et Engvall E. 1997. Integrins ($\alpha 7 \beta 1$) in muscle function and survival. *J. Clin. Invest.* 100 : 1870-1881.
- Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T. et Thompson C.B. 1997. Bcl-X_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91 : 627-637.
- Vaux D.L., Cory S. et Adams J.M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 : 440-442.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Brown R.F., Traynor-Kaplan A.E., Hayworth P.G., Prossnitz E.R., Ye R.D., Marder P., Schelm J.A. et Rothfuss K.J. 1995. Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* 154 : 2413-2422.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y. et Brown R.F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269 : 5241-5248.
- Vuori K., Hirai H., Aizawa S. et Ruoslahti E. 1996. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. *Mol. Cell Biol.* 16 : 2606-2613.
- Walen N., Kita H., Weiler D. et Gleich G.J. 1991. Glucocorticoids inhibits cytokine-mediated eosinophil survival. *J. Immunol.* 147 : 3490-3495.
- Walker N.P., Talanian P.C., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferenz C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C. et Hammil L.D. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78 : 343-352.
- Wang H.G., Tahayama S., Rapp U.R. et Reed J.C. 1996. Bcl-2 interacting protein, Bag-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 7063-7068.

- Wang X.Z. et Ron D. 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science*. 272 : 1347-1349.
- Wang Y., Huang S., Sah V.P., Ross J. Jr., Brown J.H., Han J. et Chien K.R. 1998. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct member of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* 273 : 2161-2168.
- Wary K.K., Mainiero F., Isakoff S.J., Marcantonio E.E. et Giancotti F.G. 1996. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*. 87 : 733-743.
- Wary K.K., Mariotti A., Zurzulo C. et Giancotti F.G. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 94 : 625-634.
- Wen L.P., Farhni J.A., Troie S., Guan J.L., Orth K. et Rosen G.D. 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 : 26056-26061.
- Wewer U.M. et Engvall E. 1994. Laminins. *Methods Enzymol.* 245 : 85-104.
- Williams M.J., Hughes P.E., O'Toole T.E. et Ginsberg M.H. 1994. *Trends Cell Biol.* 4 : 109
- Willie A.H., Kerr J.F.R. et Currie A.R. 1981. Cell death : the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68 : 251-305.
- Wiston B.W., Chan E.D., Johnson G.L. et Riches D.W. 1997. Activation of p38mapk, MKK3, and MKK4 by TNF-alpha in mouse bone marrow-derived macrophages. *J. Immunol.* 159 : 4491-4497.
- Wolker K.G., Hsu Y.-T., Smith C.L., Nechustan A., Xi X.G. et Youle R.J. 1997. Movement of Bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139 : 1281-1292.
- Wu X., Fan Z., Masui H., Rosen N. et Mendelsohn J. 1995. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J. Clin. Invest.* 95 : 1897-1905.
- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J. et Greenberg M.E. 1995. Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270 : 1326-1331.
- Xu H., Christmas P., Wu X.R., Wewer U.M. et Engvall E. 1994a. Defective basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 : 5572-5576.

Xu H., Wu X.R., Wewer U.M. et Engvall E. 1994b. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin $\alpha 2$ (lama2) gene. *Nature Genet.* 8 : 297-302.

Yaffe D. et Saxel Ora. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 270 : 725-727.

Yamada Y. et Kleinman H.K. 1992. Functional domains of cells adhesion molecules. *Curr. O. Cell Biol.* 4 : 819-823.

Yin X.-M., Oltvai Z.N. et Korsmeyer S.J. 1994. BH1 et BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature (London)* 369 : 321-323.

Young P.R., McLaughlin M.M., Kumar S., Kassis S., Doyle M.L., McNaulty D., Gallagher T.F., Fischer S., McDonnell P.C., Carr S.A., Huddleston M.J., Seibel G., Porter T.G., Livi G.P., Adams J.L. et Lee J.C. 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* 272 : 12116-12121.

Yousefi S., Hoessli D.C., Blaser K., Mills G.B. et Simon H.U. 1996. Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils. *J. Exp. Med.* 183 : 1407-1414.

Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M. et Horvitz H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75 : 641-652.

Yurchenco P.D. et Cheng Y.S. 1993. Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction Model. *J. Biol. Chem.* 268 : 17286-17299.

Zha J., harada H., Yang E., Jockel, L. et Korsmeyer S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor result in binding to 14-3-3 not Bcl-X_L. *Cell* 87 : 619-628.

Zhang Z., Vuori K., Reed J. et Ruoslahti E. 1995. The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and upregulates bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 6161-6165.

Zhu X., Kim J.L., Newcomb J.R., Rose P.E., Stover D.R., Toledo L.M., Zhao H et Morgenstern K.A. 1999. Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. *Structure Fold Des.* 7 : 651-661.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. et Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 *Cell* 90 : 405-413.

Zou H., Li Y., Liu X. et Wang X. 1999. An APAF-1 cytochrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspases-9. *J. Biol. Chem.* 274 : 11549-11556.